

Tesis de Posgrado

Acción combinada de películas plásticas y preservadores químicos en el almacenamiento de carne bovina refrigerada

Zamora, María Clara

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zamora, María Clara. (1985). Acción combinada de películas plásticas y preservadores químicos en el almacenamiento de carne bovina refrigerada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1908_Zamora.pdf

Cita tipo Chicago:

Zamora, María Clara. "Acción combinada de películas plásticas y preservadores químicos en el almacenamiento de carne bovina refrigerada". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1908_Zamora.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACCION COMBINADA DE PELICULAS PLASTICAS Y PRESERVADORES
QUIMICOS EN EL ALMACENAMIENTO DE CARNE
BOVINA REFRIGERADA

María Clara Zamora

Tesis presentada para optar al título
de Doctor en Ciencias Químicas

1985

Rec.

Tesis 1908
ej. 2

A mi madre
mi esposo
mis hermanas
mis sobrinos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco particularmente a la Dra. Noemí E. Zaritzky por haber posibilitado la realización de esta Tesis bajo su dirección, brindándome su amplio conocimiento y experiencia.

Al Dr. Alfredo Calvelo, Director del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, por haber brindado el lugar de trabajo.

A la Sra. Lilian Marta Macías por su dedicación en la tarea de mecanografía.

Al Sr. Fernando De Olano por su ayuda en la finalización del tipeo.

Al Sr. Vicente Valenti por su colaboración en la preparación del material.

A mis compañeros del CIDCA por su apoyo y estímulo permanente.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por permitir la concreción de este trabajo a través de las becas otorgadas.

y la disminución de la velocidad de crecimiento de los distintos microorganismos. La efectividad del sorbato se vio acentuada al descender la temperatura de almacenamiento y el pH de la carne. Así mismo, la coloración superficial de las muestras estuvo favorecida por el aumento de la concentración de la solución preservadora.

El modo de acción del ácido sórbico fue interpretado a través de dos modelos, encontrándose que, para el caso de carne bovina, el aporte de la forma disociada del ácido, es despreciable.

El crecimiento microbiano en carnes conservadas con sorbato de potasio y envasadas en películas de baja permeabilidad, también fue modelado por medio de ecuaciones matemáticas similares a las descritas en músculos no tratados. Los parámetros de crecimiento fueron descritos a través de funciones lineales del ácido no disociado.

Se realizaron medidas de los residuos de ácido producidos por las distintas soluciones empleadas, evaluándose, además, la incidencia del costo del sorbato sobre el precio de venta de la carne.

RESUMEN

La conservación de la carne refrigerada ha experimentado importantes avances con la introducción de métodos de envasado, materiales envolventes adecuados y la utilización de preservadores químicos para retardar el crecimiento bacteriano.

En el presente trabajo se han analizado los efectos de la permeabilidad gaseosa de la película de envase y la temperatura de almacenamiento (0°C y 4°C) en la composición y desarrollo de la flora microbiana de carne bovina, determinándose los recuentos aeróbicos totales, anaeróbicos, Pseudomonas sp., Brochothrix thermosphacta, Lactobacillus sp., Enterobacteriaceae y levaduras.

A través de dichas mediciones se calcularon los parámetros de crecimiento (velocidad y fase de latencia), para cada uno de los microorganismos en las distintas condiciones de envase-temperatura seleccionadas.

El desarrollo microbiano fue modelado por medio de ecuaciones matemáticas que permiten estimar la contaminación en función de los parámetros mencionados, bajo condiciones de almacenamiento que son muy comunes en la industria cárnica.

Las modificaciones de la atmósfera gaseosa del interior de los envases al vacío se interpretaron a través de balances de materia planteados para cada uno de los gases en estudio (O_2 , CO_2 y N_2). Los resultados obtenidos, a través de los mismos, fueron comparados con las medidas experimentales por cromatografía gaseosa, hallándose una satisfactoria coincidencia entre ambos valores.

El empleo de soluciones de sorbato de potasio permitió incrementar el tiempo de vida útil de la carne refrigerada. La acción inhibidora del preservador se manifestó por medio de la extensión de la fase de latencia

INDICE

CAPITULO 1: INTRODUCCION

1.1 Refrigeración de carne bovina.	1
1.1.1 Factores que afectan el desarrollo microbiano.	2
1.1.2 Influencia de la temperatura sobre la composición de la flora.	6
1.2 Envasado	10
1.2.1 Películas de alta permeabilidad al oxígeno.	11
1.2.2 Películas de baja permeabilidad al oxígeno.	13
1.2.2.1 Envasado al vacío.	13
1.2.2.2 Atmósfera modificada	16
1.2.2.3 Atmósfera controlada	18
1.3 Preservadores químicos	18
1.3.1 Ácidos orgánicos empleados en la industria alimenticia.	21
1.3.2 Ácido sórbico.	22
1.3.2.1 Efectividad como agente antimicrobiano en productos cárnicos.	22
1.3.2.2 Toxicidad: Aguda, subcrónica y crónica.	27
1.4 Objetivos.	29

CAPITULO 2: MATERIALES Y METODOS

2.1 Materia prima	33
2.1.1 Músculo cárneo	33
2.1.2 Películas plásticas: propiedades.	33
2.2 Técnica de envasado.	34
2.2.1 Aplicación de la presión interior del envase.	34
2.2.2 Autocostracción de la película	34

2.3 Almacenamiento	35
2.4 Técnica de muestreo para recuentos microbianos.	35
2.4.1. Localización de los microorganismos en el tejido.	35
2.4.2 Mecanismos de adhesión bacteriana a la superficie de la carne y su influencia sobre los recuentos.	37
2.4.3 Distribución de la población microbiana.	40
2.5 Selección de medios de cultivo para recuentos microbianos.	41
2.5.1 Recuento aerobio	41
2.5.2 Recuento anaerobio	42
2.5.3 <u>Pseudomonas</u>	42
2.5.4 <u>B. thermosphacta</u>	43
2.5.5 Lactobacilos	44
2.5.6 <u>Enterobacteriaceae</u>	44
2.5.7 Levaduras	44
2.5.8 <u>S. aureus</u>	44
2.5.9 <u>Salmonella</u>	44
2.6 Identificación de bacterias	44
2.6.1 Esquemas de identificación	45
2.6.2 Detección de <u>S. aureus</u>	47
2.6.3 Identificación de <u>Enterobacteriaceae</u>	47
2.7 Medición de la coloración superficial	49
2.8 Determinación de la composición de la atmósfera gaseosa	50
2.9 Soluciones preservadoras	52
2.9.1 Técnica de aplicación	52
2.9.2 Dosaje de ácido sórbico en carne	53
2.9.3 Determinación del efecto antimicrobiano del sorbato en medios de cultivo.	53

CAPITULO 3: EFECTO DE LA TEMPERATURA Y PERMEABILIDAD DE LA PELICULA DE ENVASE
SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO EN CARNES REFRIGERADAS

3.1 Composición inicial de la flora microbiana	54
3.2 Influencia de la termocontracción de la película de EVA - SARAN - EVA sobre los recuentos iniciales	59
3.3 Desarrollo microbiano sobre carnes envasadas en películas permeables al oxígeno	59
3.3.1 Resultados	59
3.3.2 Discusión	60
3.4 Desarrollo microbiano sobre carnes envasadas en películas de baja permeabilidad al oxígeno	63
3.4.1 Resultados	63
3.4.2 Discusión	67
3.5 Interpretación del crecimiento microbiano a través de un modelo matemático.	70
3.5.1 Determinación de los parámetros: velocidad de crecimiento y período de latencia	70
3.5.2 Propagación de errores	75
3.6 Aplicaciones del modelo	76
3.6.1 Determinación de la composición de la flora microbiana durante el almacenamiento.	76
3.6.2 Tiempo de maduración	77
3.6.3 Predicción de la vida útil de la carne	79
3.7 Efecto de la permeabilidad del envase sobre la coloración superficial	80

CAPITULO 4: MODIFICACION EN LA COMPOSICION GASEOSA DEL INTERIOR DE LOS
ENVASES AL VACIO

4.1 Medición cromatográfica	82
4.2 Estimación de los parámetros que interpretan las modificaciones en la composición gaseosa del interior de los envases al vacío	84
4.2.1 Consumo de oxígeno por el tejido (R)	84
4.2.1.1 Consumo enzimático	84
4.2.1.2 Oxigenación de la mioglobina	87
4.2.1.3 Oxidación lipídica	89
4.2.2 Demanda bacteriana de oxígeno (Rb)	89
4.2.3 Disolución de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono	90
4.2.4 Penetración de oxígeno en el tejido (δ)	92
4.2.5 Producción de dióxido de carbono (G)	95
4.2.6 Permeabilidad gaseosa de la película (P)	97
4.3 Representación matemática de la evolución de la atmósfera gaseosa que rodea al músculo a través de balances de materia	97

CAPITULO 5: EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SORBATO DE POTASIO SOBRE EL
DESARROLLO MICROBIANO

5.1 Carnes bovinas envasadas en películas permeables al oxígeno	101
5.2 Carnes bovinas envasadas en películas de baja permeabilidad al oxígeno	106
5.3 Análisis de la acción inhibitoria del sorbato de potasio	122
5.3.1 Modelo matemático basado en la acción inhibitoria del ácido no diso- ciado	122
5.3.2 Modelo basado en la acción inhibitoria de las fracciones disociada y no disociada del ácido	124

5.3.3 Determinación del Índice de Inhibición (I) y de la mínima concentra	125
ción inhibitoria (m.c.i.) en medios de cultivo.	
5.3.4 Determinación del Índice de Inhibición (I) y de la mínima concentra	133
ción inhibitoria (m.c.i.) en carne bovinas.	
5.3.4.1 Dosaje de sorbato de potasio en carne.	133
5.3.4.2 Aplicación de los modelos de acción inhibitoria del ácido sórbico	135
a carnes bovinas	
5.4 Modelado del crecimiento microbiano en carnes bovinas conservadas con	138
sorbato de potasio	
5.4.1 Determinación de los parámetros μ' y θ' en función de la concentra	140
ción de ácido sórbico no disociado	
5.4.2 Estimación del número de microorganismos	142
5.4.3 Determinación de los niveles de sorbato de potasio que duplican	143
el t_{10}^7	
5.5 Análisis de la aplicabilidad del sorbato de potasio en carne	145
<u>CAPITULO 6: CONCLUSIONES</u>	148
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	153
<u>APENDICE 1</u>	169
<u>APENDICE 2</u>	171
<u>APENDICE 3</u>	178
<u>APENDICE 4</u>	180
<u>NOMENCLATURA</u>	222

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Refrigeración de Carne Bovina

La carne fresca es uno de los alimentos mas perecederos, y por ello es preciso aplicar los procedimientos de conservación inmediatamente después del sacrificio. La refrigeración es el medio más común y mejor para conservar la carne durante un período de tiempo relativamente corto. Comparando la refrigeración con otras técnicas de preservación, ésta permite conservar los productos sin alterar sus características originales; generalmente tienen una menor degradación de color, aroma, sabor, textura y valor nutritivo. Aunque la congelación proporciona una preservación mayor que la refrigeración, esta última requiere menor energía y es a menudo preferida por el consumidor.

La eficiencia de la refrigeración depende de la calidad microbiológica de la materia prima, del tiempo de enfriamiento y de las condiciones de almacenamiento (Nottingham, 1982). Con respecto a la calidad de la materia prima, la contaminación de las reses no puede ser evitada, pero es posible limitarla y controlar sus efectos por el uso de métodos de sanitación apropiados.

El tiempo de enfriamiento tiene gran influencia sobre la velocidad de crecimiento de los microorganismos, pero no afecta a la flora microbiana que desarrolla en la superficie debido a que ésta se enfría rápidamente. Cuando una res caliente (38-40°C) es colocada en una cámara entre -1°C a + 5°C su superficie alcanza esas temperaturas en aproximadamente 3 horas. El enfriamiento de los músculos internos es más lento porque está limitado por la velocidad de transferencia de calor. En la práctica, las reses podrían ser enfriadas por debajo de 20°C tan pronto como sea posible para li

mitar el crecimiento bacteriano y el subsiguiente deterioro. Para prevenir el fenómeno de putrefacción del hueso es necesario bajar la temperatura del centro de la res a 15°C dentro de las 18 horas, y luego a 5°C en menos de 48 horas. Sin embargo un rápido enfriamiento no favorece los deseables cambios bioquímicos del músculo y puede tener efectos perjudiciales sobre alguna de las cualidades organolépticas.

Un rápido descenso de la temperatura, luego de la muerte, podría producir el fenómeno de acortamiento por frío causado probablemente por la ineficiencia del retículo sarcoplásmico para retener iones calcio. El acortamiento hasta el 40 % de la longitud inicial implica una mayor interdigitación de los filamentos de actina y miosina, con un incremento en la formación de enlaces cruzados durante la instauración del rigor mortis, que se traduce en una mayor dureza de la carne. Estos efectos son mas importantes cuando los músculos son separados de los huesos durante el despostamiento en caliente.

La estimulación eléctrica de la musculatura de la res ha generado mucho interés en los últimos años como un medio de acelerar el descenso del pH post-mortem y el establecimiento del rigor. La técnica es particularmente útil cuando la carne se somete inmediatamente después del sacrificio a un enfriamiento rápido o congelación, ya que al acelerar la caída del pH, se evita el riesgo de acortamiento por frío de la carne y su consecuente dureza. El pH final se alcanza dentro de las 4 horas en comparación con las 15-20 horas en las reses no estimuladas (Bendall, 1980).

1.1.1 Factores que Afectan el Desarrollo Microbiano

El medio ambiente que proporciona la carne para el crecimiento microbiano difiere en gran extensión del músculo vivo. Luego de la muerte, el

músculo sufre cambios físicos con el desarrollo del rigor; estos que son plásticos y altamente extensibles durante la vida se hacen rígidos e inextensibles. La composición del músculo (aproximadamente 75% de agua, 18% de proteína y 3% de grasa) no es afectada por el desarrollo del rigor, pero grandes cambios ocurren en las concentraciones de algunos componentes solubles de bajo peso molecular. El más evidente de esos cambios es el agotamiento de los compuestos fosforados de alta energía, como la adenosina tri-fosfato (ATP), la creatina-fosfato (CP) y la degradación de glucógeno a ácido láctico con la resultante del descenso del pH. La concentración de glucógeno está directamente relacionada con el pH final alcanzado por la carne. La concentración final de glucosa es baja, pero, como es el sustrato usado preferencialmente por los microorganismos, tiene un importante efecto en retardar el tiempo de deterioro.

La microbiología de la carne y sus productos ha sido frecuentemente estudiada con el objeto de determinar la inocuidad y preservación de la calidad. Los métodos usados tradicionalmente involucran recuentos e identificación de los microorganismos presentes. Esto ha sido la base de numerosas investigaciones que desarrollaron criterios (normas y especificaciones) sobre la manufactura y comercialización de productos cárnicos. Los análisis, generalmente, proporcionaban información sobre descripciones taxonómicas de las poblaciones microbianas presentes, más que descripciones funcionales basadas en los atributos fisiológicos que afectan las propiedades del alimento. Entre esos atributos se pueden incluir productos metabólicos que afectarían el color, aroma, sabor, pH o estructura, o ser tóxicos para el consumidor. Mientras la enumeración de alimentos que sufren el ataque de bacterias causantes de enfermedades está, en la mayoría de los casos, directamente relacionado al potencial riesgo de in

toxicación alimentaria, la relación entre recuentos microbianos y deterioro no está tan bien definida. Al respecto es importante reconocer la naturaleza imprecisa de los indicadores de calidad tradicionales cuando se considera la pérdida de calidad en productos cárneos. Sería por lo tanto, necesario y de suma utilidad determinar y predecir las interacciones entre los microorganismos y los productos cárnicos.

Las características de las poblaciones microbianas que desarrollan en dichos productos son el resultado de los efectos provocados por las condiciones predominantes del medio ambiente sobre el crecimiento de la flora microbiana inicial. El tipo y la concentración de sustancias químicas, especialmente compuestos de degradación, producidas por los microorganismos y las enzimas autolíticas de la carne bajo condiciones particulares de almacenamiento, a menudo causan el desarrollo de aromas, sabores y texturas deseables, pero, finalmente siempre son asociados con cambios que el consumidor reconoce como deterioro (Alford y Col., 1971; Freeman y Col., 1976; Ford y Park, 1980).

Los factores que afectan el desarrollo microbiano en un alimento se los puede clasificar en intrínsecos y extrínsecos (Mossel e Ingram, 1955). Los factores intrínsecos son predominantemente químicos e incluyen la concentración y disponibilidad de nutrientes, pH, potencial redox, capacidad buffer y actividad acuosa. La estructura de la carne es también una propiedad intrínseca que afecta la difusión y las propiedades térmicas y mecánicas. Los factores extrínsecos están relacionados principalmente con las condiciones del proceso y almacenamiento, tales como temperatura, composición y humedad relativa de la atmósfera gaseosa que rodea la carne. Un factor extrínseco, que es un importante agente selectivo, es el dióxido de carbono producido naturalmente durante

el crecimiento de bacterias aeróbicas, tales como *pseudomonas* y constituye un factor importante cuando se usan películas impermeables a gases, como por ejemplo en el envasado al vacío. Cuando una pieza de carne no llega a un equilibrio con el medio circundante, se pueden formar dentro de la misma gradientes de concentraciones de gas, a_w y temperatura y esos gradientes serían los responsables de las diferencias entre las clases de bacterias que crecen en la superficie y debajo de la misma. Los factores extrínsecos son a menudo manipulados para extender la vida útil de la carne.

Los microorganismos interaccionan entre sí y con el ambiente de tal manera que cada especie incrementaría su número a una velocidad que es función de las propiedades físicas y químicas del ambiente. Usualmente, microorganismos característicos están asociados con productos que tienen propiedades intrínsecas características, pero su crecimiento o supervivencia no está gobernada solamente por esos factores. Entre los factores adicionales están los efectos de la competencia entre organismos, los cuales provocan cambios químicos en el medio generando una sucesión microbiana. En los productos almacenados durante largos períodos las especies mas numerosas van cambiando con el tiempo. Cuando no hay competencia por un sustrato limitante los microorganismos pueden crecer independientemente unos de otros y eventualmente ser inhibidos por sus propios productos metabólicos, como por ejemplo, ácido láctico o dióxido de carbono, o por agotamiento de un sustrato limitante como la glucosa o un aminoácido. La acción interespecies se manifiesta cuando hay competencia por un sustrato limitante. Newton y Gill (1980) opinaban que la flora deteriorante que desarrolla en carne fresca está determinada por la competencia de sustratos. El predominio de una especie estaría regido por los niveles iniciales, la afinidad relativa por el sustrato, la

disponibilidad de sustrato, las velocidades relativas de crecimiento de las especies competidoras (por ej. como función de la temperatura) y la producción de sustancias antimicrobianas.

Otro tipo de interacciones ocurre cuando el producto metabólico de una especie actúa como sustrato limitante para otra, pudiéndose formar una sucesión de especies. Esto puede ocurrir en productos cárnicos cuando una especie le permite desarrollar a otra iniciando la ruptura de un sustrato; por ejemplo, convirtiendo un polímero de hidratos de carbono en monómeros tales como glucosa que pueden ser metabolizados por una mayor cantidad de organismos. También se pueden producir efectos sinérgicos si una especie altera el pH o potencial redox, o antagonismos cuando los productos metabólicos de una especie o los cambios causados al medio limitan el crecimiento de otra. El antagonismo microbiano es utilizado por manipulación de las condiciones del medio para controlar la competencia y favorecer el crecimiento de especies particulares, especialmente bacterias ácido lácticas. El predominio de lactobacilos como organismos deteriorantes en muchas carnes procesadas sugiere que el antagonismo es de mayor importancia en la selección microbiana de productos cárnicos.

1.1.2 Influencia de la Temperatura sobre la Composición de la Flora

Aunque muchas especies bacterianas han sido aisladas de la carne, relativamente pocas son las que constituyen la flora predominante a temperaturas de refrigeración. Cepas de Pseudomonas, Moraxella, Acinetobacter, Lactobacillus, Brochothric thermosphacta (anteriormente llamado Microbacterium thermosphactum, Sneath y Jones, 1976) y ciertos géneros de la familia Enterobacteriaceae son los tipos mas comunmente encontrados.

El aislamiento de especies de Flavobacterium, Alcaligenes, Vibrio, Aeromo-

nas y Arthrobacter es informado menos frecuentemente (Ingram y Dainty, 1971; Sutherland y Col., 1975; Hanna y Col., 1977). La composición de la flora depende del tiempo y de las condiciones de almacenamiento.

Una buena preservación de la calidad de la carne se logra enfriándola lo más rápido posible a temperaturas cercanas a 0°C. De esta manera se inhibe el crecimiento de anaerobios, bacterias mesófilas responsables de la putrefacción interna, de patógenos y su producción de toxina.

El desarrollo de algunos microorganismos patógenos es inhibido a las siguientes temperaturas (Rosset, 1982) :

- 3.3°C: inhibición de la producción de toxina por Clostridium botulinum tipo E.
- 5.2°C: Inhibición del crecimiento de Salmonella.
- 6.5°C: Inhibición del crecimiento de Cl. perfringens (que ya está disminuido por debajo de 20°C).
- 6.7°C: inhibición del crecimiento de Staphylococcus aureus.
- 10°C : inhibición de la producción de toxina por S. aureus.
- 10°C : inhibición de la producción de toxina por Cl. botulinum tipos A y B.

Mackey y Col. (1980) midieron velocidades de crecimiento, a temperaturas de refrigeración, de distintos serotipos de Salmonella inoculados sobre carne bovina, no observando crecimiento entre 7°C y 8°C. Por lo tanto, manteniendo una temperatura interna inferior a 10°C durante la operación de despostado sería suficiente para evitar el desarrollo de estas bacterias.

El crecimiento de estafilococos enterotoxigénicos en alimentos es afectado por el desarrollo de otros microorganismos competitivos (Peterson y Col., 1962 a, b) como las bacterias lácticas (Kao y Frazier, 1966;

Mc Coy y Faber, 1966) que desarrollan especialmente en productos envasados al vacío.

Los productos cárnicos incriminados en casos de intoxicaciones estafilocócicas son usualmente aquellos que han sido calentados antes de ser sometidos a un inadecuado manipuleo y refrigeración. Las carnes que son consumidas inmediatamente después del calentamiento o sin ser cocidas raramente son responsables de este tipo de intoxicaciones.

Casman y Col. (1963) observaron que las carnes cocidas soportan mejor el desarrollo de estafilococos que las crudas, atribuyéndolo a la imposibilidad de estos microorganismos de competir con la flora natural de la carne cruda.

El envasado de carne y productos cárnicos con películas de baja permeabilidad al oxígeno han sido foco de atención por el potencial riesgo de intoxicación botulínica. Pivnick y Bird (1965) señalaron, que el riesgo no solamente existe por el vacío del envase sino también por el cambio de flora que podría permitir el desarrollo y producción de toxina de Cl. botulinum antes que el producto muestre signos visibles de descomposición.

Grecz y Arvay (1982) observaron la germinación de esporas de Cl. botulinum tipo E a 2°C. Esto es especialmente crítico si, inadvertidamente, se las somete a un corto período de temperatura abusiva, permitiendo durante ese lapso el desarrollo de las esporas que habían germinado a baja temperatura. Estos datos reenfatan el potencial peligro de Cl. botulinum tipo E en alimentos refrigerados. Afortunadamente este organismo no se ha detectado en carne fresca, generalmente se lo encuentra en productos marinos.

Hay dos razones por las cuales las bajas temperaturas reducen el crecimiento de bacterias psicrófilas sobre la superficie de la carne:

- (i) Extensión de la fase de latencia
- (ii) Reducción de la velocidad de crecimiento

En una flora mixta de psicrófilos y mesófilos, las bajas temperaturas tienen una acción selectiva y pueden afectar la composición de la contaminación inicial o producir cambios en la flora que desarrolla durante el procesamiento o almacenamiento.

Las pseudomonas son las bacterias que crecen más rápido sobre la superficie de la carne. Su velocidad de crecimiento está menos influenciada por los cambios de temperatura que la de sus competidoras, lo que explica su predominio en la microflora de la carne fresca.

Casi todas las bacterias que desarrollan cerca de 0°C son especies aeróbicas, ellas crecen muy rápidamente sobre la superficie de la carne almacenada en cámaras refrigeradas con atmósferas húmedas. Los géneros anaerobios facultativos (Lactobacillus, B. thermosphacta y algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae) desarrollan más lentamente y la putrefacción externa usualmente precede al enverdecimiento y agriado inducido por estos microorganismos.

En atmósferas más secas, el crecimiento bacteriano sobre la superficie es retardado por el efecto localizado de secado del aire; los hongos comienzan a desarrollar sobre la superficie y entre las especies encontradas figuran Aspergillus, Cladosporium y Thamnidium (una especie proteolítica) (Jay, 1970) , así como también Penicillium y Mucor (Gunderson y Peterson, 1977; Ingram y Dainty, 1971). Los hongos pueden estar involucrados en la hidrólisis de lípidos y reacciones oxidativas. Entre las levadu

ras que han sido detectadas sobre la superficie de la carne refrigerada, cabe mencionar a Candida, Monilia y Torula (Drieux, 1976).

La flora deteriorante está generalmente dominada por aquellas especies que se adaptan a las condiciones en que la carne es mantenida. A temperaturas de refrigeración especies de Pseudomonas y Lactobacillus crecen más rápidamente que las especies competitivas, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas respectivamente. Sin embargo, las bacterias inicialmente presentes sobre la carne derivan generalmente del cuero del animal y son predominantemente mesófilas (Newton y Col., 1978). Por lo tanto se podría esperar que el almacenamiento a temperaturas más altas permita el desarrollo de una flora de diferente composición que aquella encontrada a temperaturas de refrigeración. Bajo condiciones aeróbicas las pseudomonas son las especies mayoritarias presentes en la flora de la carne almacenada a temperaturas hasta 20°C, pero a niveles térmicos más elevados éstas son parcialmente desplazadas por especies mesófilas de Acinetobacter y Enterobacteriaceae. Anaeróticamente a 20°C, los lactobacilos son desplazados por algunos géneros de la familia Enterobacteriaceae, pero a 30°C la flora es dominada por clostridios mesófilos.

No obstante, la refrigeración sólo puede asegurar una limitada vida útil; es posible extenderla por manipulación de otros factores tales como actividad acuosa (aw), presión parcial de oxígeno y dióxido de carbono.

1.2 Envasado

Modernos métodos de comercialización de la carne han permitido el desarrollo de sistemas de envasado para proteger al producto durante la distribución a nivel mayorista y ofrecer al consumidor carne en condiciones higiénicas y de fácil preparación.

La carne pierde humedad por evaporación, lo que no solamente ocasiona una pérdida de peso sino que además provoca un secado superficial y comienza a oscurecerse. Tales cambios son evitados con envases de baja permeabilidad al vapor de agua que también proporcionan una protección contra la contaminación y previenen el exudado.

Todas las formas de envasado alteran el ambiente al que las bacterias están expuestas; el principal cambio es la modificación de la atmósfera gaseosa que tiene influencia sobre el color de la carne y determina la extensión y tipo de deterioro que desarrolla durante el almacenamiento. La diferencia fundamental entre los distintos materiales de envase es la permeabilidad al oxígeno y en consecuencia, la cantidad disponible del mismo durante el almacenamiento. La carne contiene enzimas respiratorias que permanecen activas después de algún tiempo de producida la muerte del animal; dichas enzimas consumen oxígeno y producen dióxido de carbono, al principio a gran velocidad y luego más lentamente pero continuando por algunos días. Adicionalmente, las bacterias aeróbicas de la superficie de la carne también consumen oxígeno y producen dióxido de carbono. La carga bacteriana inicial es baja y, por lo tanto, la producción y consumo de gases por las bacterias no es significativa; pero a medida que la población alcanza los niveles de deterioro, el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos se acerca al de la carne. Por lo tanto, la atmósfera interna está determinada por la capacidad de la carne y las bacterias de remover el oxígeno y por el intercambio gaseoso a través del material empleado.

1.2.1 Películas de Alta Permeabilidad al Oxígeno

Con películas de alta permeabilidad al oxígeno la atmósfera interna

no se modifica, se mantiene el color rojo brillante en la superficie y el crecimiento microbiano sólo es regulado por la refrigeración. El color se deteriora rápidamente y el desarrollo bacteriano es muy intenso; por lo tanto, la vida útil del producto es muy corta dependiendo de la contaminación inicial y de la temperatura de almacenamiento.

Pseudomonas sp. son la principal causa de deterioro pero los géneros Moraxella, Enterobacter, B. thermosphacta y Acinetobacter pueden también estar presentes (Gill y Newton, 1978).

El deterioro comienza a evidenciarse cuando las bacterias están aún en la fase de crecimiento logarítmico siendo el factor crítico la disponibilidad de glucosa, debido a que la mayoría de las especies utilizan ese sustrato preferencialmente. Mientras las bacterias crecen sobre la superficie, la glucosa debe difundir desde la masa de carne a medida que se va agotando en la superficie. Cuando los microorganismos no pueden obtener la cantidad de glucosa suficiente para sus requerimientos, comienzan a degradar aminoácidos lo que provoca un aumento de la concentración de amonio; estos cambios van acompañados por la aparición de olores desagradables (Gill, 1976).

Las carnes DFD (oscuras, firmes y secas) provienen generalmente de animales con poca reserva de glucógeno y tienen un alto pH final (pH > 5.9) (Newton y Gill, 1978a). Este tipo de carne se deteriora más rápido que la carne normal y esto ha sido tradicionalmente atribuido a una mayor velocidad de crecimiento bacteriano debido al elevado pH de las mismas. En realidad, la velocidad de crecimiento de pseudomonas y otros organismos aeróbicos comunes no es afectada por el pH de la carne. Por lo tanto, no se puede justificar a través del pH el rápido deterioro de las carnes DFD. Una explicación alternativa sería que las bacterias podrían

utilizar aminoácidos en niveles de desarrollo anteriores a aquellos alcanzados en la carne normal. Como resultado de la degradación de aminoácidos se producen olores y sabores desagradables, los cuales serían detectados a una menor densidad celular. Es importante considerar que el elevado pH puede permitir el crecimiento de organismos que son inhibidos al pH normal de la carne (ej. Alteromonas putrefaciens).

Newton y Gill (1978a) estudiaron el rol de la glucosa mediante el crecimiento de pseudomonas sobre carne DFD tratadas con glucosa y/o ácido láctico para dar concentraciones de esas sustancias similares a las presentes en condiciones normales, comprobando que la adición de glucosa extendía los tiempos de almacenamiento.

1.2.2 Películas de Baja Permeabilidad al Oxígeno

El uso de películas plásticas de baja permeabilidad a gases permitió extender la vida útil de la carne refrigerada.

1.2.2.1 Envasado al Vacío

El propósito del envasado al vacío es reducir el volumen del aire en contacto con la carne; los cambios en las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono tienen un efecto selectivo sobre la flora que desarrolla, siendo dominada en este caso por especies de Lactobacillus.

El color de la carne está gobernado por la presencia de mioglobina; al final del almacenamiento la carne es reenvasada en películas permeables al oxígeno para permitir la formación de oximioglobina. El grado en que esto ocurre depende de los cambios que han tenido lugar durante el almacenamiento. La recuperación del color es mayor y más completa bajo condiciones libres de oxígeno donde la formación de metamio-

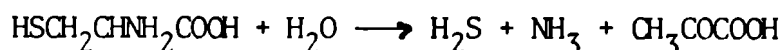
globina es mínima.

Se ha sugerido que el envasado con películas impermeables a gases producen su efecto sobre la microflora a través de la acumulación de dióxido de carbono más que al agotamiento del oxígeno. Esa sugerencia se originó porque las concentraciones de oxígeno del interior del envase eran superiores al 1%, mientras que la inhibición de Pseudomonas sp. no ocurre si esas concentraciones son superiores al 0.8%. La medida de la composición gaseosa es dificultosa y por lo tanto hay algunas dudas con respecto a la verdadera concentración de oxígeno en los experimentos reportados en la literatura; sin embargo, estudios más recientes han mostrado que pueden ser logrados niveles muchos más bajos. Newton y Col. (1977) detectaron Pseudomonas sp. en carne almacenada en atmósfera con baja tensión de oxígeno conteniendo dióxido de carbono, pero no en atmósferas libres de oxígeno con o sin dióxido de carbono. Esto indica que mientras el dióxido de carbono puede reducir la velocidad de crecimiento de Pseudomonas sp., la completa inhibición de las mismas solamente se logra a través de la eliminación del oxígeno.

Los lactobacilos pueden crecer y persistir en la máxima densidad celular sin causar algún deterioro evidente. Luego de aproximadamente 15 semanas a - 1°C la carne vacuna envasada tiende a ser menos aceptable por la pérdida de textura y aroma característico que por el deterioro microbiano (Newton y Rigg, 1979). Esos aromas son debidos probablemente a la formación de ácidos grasos de cadena corta como acético, propiónico e isobutírico. Hay también evidencia de la acumulación de aminas como resultado de la actividad bacteriana. Ambos grupos de sustancias parecen derivar de la ruptura de aminoácidos. En carne envasada al vacío no se produce una significativa ruptura de proteínas. Los organismos Gram - po-

sitivos que predominan en la flora no muestran actividad proteolítica y la producción de enzimas proteolíticas por los Gram - negativos presentes podría estar inhibida por las condiciones de almacenamiento. La hidrólisis de la grasa es posible pero no se sabe con certeza si la lipólisis hace una contribución significativa al deterioro de la carne. (Sutherland y Col., 1975).

La carne DFD envasada al vacío sufre, sin embargo, un rápido y característico deterioro por enverdeamiento. Esa coloración verdosa se debe a la combinación del sulfuro de hidrógeno con el pigmento vascular formando sulfomioglobina (verde). El sulfuro de hidrógeno y el amonio se producen como resultado de la conversión de cisteína a piruvato por la enzima bacteriana cisteína disulfidrasa (Gill, 1982).



El deterioro de la carne se manifiesta además con olores pútridos. El análisis de la flora de la carne DFD muestra la presencia de un número de especies que usualmente no desarrollan en carne normal. De esas especies Enterobacter liquefaciens fue responsable de los olores y Alte-romonas putrefaciens del enverdeamiento. La producción de los olores podría ser suprimida por el agregado de glucosa, de la misma manera que en condiciones aeróbicas, pero el enverdeamiento no sería afectado dado que A. putrefaciens degrada la cisteína con desprendimiento del H_2S aún en presencia de glucosa (Gill y Newton, 1979). Para que no ocurra ese fenómeno es necesario inhibir el crecimiento de A. putrefaciens. Estas especies asociadas a la carne DFD envasada al vacío son inhibidas cuando el pH es inferior a 6.0. El pronto deterioro de la carne puede ser prevenido por la adición al envase de pequeñas cantidades de buffer citrato que reduce

el pH superficial, inhibiendo el crecimiento de esos organismos y permitiendo el desarrollo de una flora dominada por lactobacilos. El pH de la superficie se eleva cuando se llega al equilibrio entre el buffer y la masa de carne, pero el enverdecimiento no ocurre, probablemente, porque los lactobacilos continúan la inhibición de esos organismos (Newton y Gill, 1980).

Yersinia enterocolitica también ha sido reportada como otra de las bacterias encontradas en carnes DFD envasadas al vacío (Hanna y Col., 1976; Seelye y Yearbury, 1979), aunque estos organismos aparentemente no han sido causa de deterioro.

1.2.2.2 Atmósfera Modificada

Como una alternativa del envasado al vacío se ha intentado almacenar la carne bajo distintas atmósferas gaseosas (Taylor, 1971; Newton y Col., 1977; Christopher y Col., 1979 a, b). Generalmente la intención ha sido la de preservar el color de la carne fresca y prevenir el deterioro anaeróbico por el uso de altas concentraciones de oxígeno (50-100%) junto con un 15-50% de dióxido de carbono para restringir el crecimiento de Pseudomonas sp. y bacterias relacionadas. Sin embargo, en la práctica, la vida de almacenamiento de los paquetes que contienen altas concentraciones de oxígeno es menor que la obtenida con los envases al vacío. Como la... carne continúa consumiendo oxígeno la composición de la mezcla gaseosa cambia durante el almacenamiento. Por ejemplo, luego de 35 días, los envases que originalmente contenía 100% de oxígeno tienen una apariencia y una composición gaseosa similar a la de los envases al vacío (Seideman y Col., 1979). Una más alta incidencia de malos olores y superficie con alto contenido de metamioglobina fue relacionado con una mayor población

de Pseudomonas sp. sobre la carne. Inicialmente especies de Pseudomonas, Moraxella y Acinobacter constituyen el 85.4% de los recuentos. Luego de 21 a 35 días a 1-3°C, Pseudomonas sp. forman el 19.9 al 52.2% de la población microbiana de carne inicialmente envasada en 100% de O_2 , pero solamente el 8.7 al 18.2% sobre carne envasada al vacío (Christopher y Col., 1979 a). Aunque lactocilos fue la especie dominante en todos los envases luego de 28-35 días de almacenamiento, otros organismos pueden estar presentes en significativo número sobre carne bovina almacenada en atmósferas conteniendo inicialmente un 50-100% de O_2 . Similares resultados fueron obtenidos con cerdo envasado en distintas atmósferas gaseosas (Christopher y Col., 1979 b).

El uso de mezclas gaseosas compuestas por un 20% de CO_2 y 80% de N_2 dan resultados similares al envasado al vacío. Para intervalos superiores a 7 días el porcentaje de metamioglobina de la superficie de la carne envasada al vacío o en 20% CO_2 + 80% N_2 es sustancialmente menor que el obtenido con atmósferas de altos niveles de oxígeno. La concentración de metamioglobina guarda un estrecho paralelismo con el color superficial indicando que en la mayoría de los cortes el deterioro del color está asociado a la conversión de los pigmentos musculares a la forma oxidada. Elevados niveles de CO_2 también tienen efectos negativos sobre el color, encontrándose que concentraciones del 15 al 20% del mismo son parcialmente inhibitorias del crecimiento bacteriano y no afectan el color (Clark y Lentz, 1969; 1972; 1973; Taylor y Mac Dougall, 1973; Sutherland y Col., 1977).

Los sistemas de envasado al vacío y atmósfera modificada descritos hasta ahora corresponden a cortes individuales. Un sistema de atmósfera modificada en contenedores ha sido desarrollado para el almacena-

miento y transporte de carne fresca. En un contenedor hipobárico, la temperatura, presión y humedad están controladas. Bajo vacío, los niveles de oxígeno pueden reducirse a valores inferiores al 0.2%, inhibiéndose, por lo tanto, los aerobios estrictos. Las reses se han mantenido sin deterioro por más de 45 días a -1°C , con una presión de 10 mm Hg y una humedad relativa del 95% (Mermelstein, 1979).

1.2.2.3 Atmósfera Controlada

En el sistema de atmósfera controlada la concentración de gases se seleccionada es mantenida durante el almacenamiento, mientras que en el de atmósfera modificada se hace solamente una carga inicial, consistente con los requerimientos esperados del producto y la duración del transporte. En ambos tipos de sistemas deben ser considerados los cambios dinámicos debidos a la permeación de gas, fugas, absorción, y/o conversión bioquímica por la actividad respiratoria. En muchos casos, la atmósfera controlada es técnicamente superior a la atmósfera modificada, pero a menudo no es la suficientemente ventajosa como para balancear el menor costo de esta última debido a que sus requerimientos mecánicos son menos complejos (Wolfe, 1980).

A través de lo expuesto se puede concluir que, hasta el momento, el envasado al vacío es el método más eficiente y económico para extender la vida útil de la carne refrigerada.

1.3 Preservadores Químicos

La producción, distribución y consumo de alimentos han evolucionado mucho y necesitan lógicamente el concurso de nuevos medios, como la adición de correctores para el gusto, de aditivos que mejoren la textura, el

color e incluso el valor nutritivo de los productos alimenticios, ya que en las materias primas frecuentemente es muy variable.

Existe una revisión permanente de los aditivos en cuanto a su utilidad según los avances tecnológicos, conocimientos toxicológicos, etc.. Se entiende por aditivo alimentario toda sustancia, o mezcla de sustancias que, sin constituir por si misma un alimento ni poseer valor nutritivo (o si lo tienen, su uso no depende de este valor), se agrega intencionadamente a los alimentos en cantidad mínima, con el objeto de modificar sus características organolépticas, mejorar o facilitar su proceso de elaboración, conservación y/o su uso.

Entre los criterios para juzgar la inocuidad de una sustancia-aditivo, se tienen en consideración los siguientes: toxicidad aguda, subcrónica, crónica, acción cancerígena, mutagénica, teratógena, comportamiento bioquímico (Mohino Sanchez, 1984).

Aunque las consideraciones de orden toxicológico son las prioritarias al evaluar un aditivo, existen otras como la justificación de su empleo tecnológico, que no sirva para enmascarar una deficiencia del alimento o la materia prima a emplear, o induzca a error al consumidor.

Sucede con frecuencia que según sean las costumbres alimenticias de las poblaciones en las diversas regiones, los contenidos máximos tolerables para un aditivo determinado en un alimento no serán iguales, estando lógicamente en relación con la cantidad de dicho alimento que ingieran diariamente.

En principio, el uso de un aditivo, en las dosis autorizadas por la legislación no comporta ningún riesgo de toxicidad, ya que han pasado previamente una evaluación toxicológica, que ha permitido definir una Ingesta Diaria Admisible, expresada en mg o gr por kilo de peso corporal.

El empleo de aditivos alimentarios resulta necesario y usados en las cantidades autorizadas no suponen ningún peligro para la salud del consumidor; muchas veces, por una información deformada, se los considera como sustancias puramente químicas, sospechosas, potencialmente peligrosas o nocivas por completo, olvidándose que los alimentos están compuestos de una multitud de sustancias químicas naturales muy complejas, que se sintetizan en las células vegetales o animales y que pueden ser compuestos antinutricionales e incluso tóxicos.

Los aditivos, supuesto el cumplimiento de los principios básicos para la autorización de su uso, son ingredientes fundamentales en la alimentación de hoy y a ellos se debe el aprovechamiento de numerosos nutrientes, siendo por tanto una de las armas de la humanidad contra el hambre y la distribución racional de las materias primas. Para justificar su uso debe darse el suficiente valor al concepto de Riesgo/Beneficio.

Un preservador químico ideal debe ser capaz de inhibir el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias, no ser tóxico, no debe almacenarse en tejido graso, ser soluble en agua pues si se solubiliza en lípidos no podría aprovecharse su acción antimicrobiana dado que los microorganismos crecen en la fase acuosa de los alimentos, ser estable en el producto y no reaccionar con otros aditivos o componentes naturales del alimento, no presentar sabor, olor o color. Es muy difícil encontrar compuestos que sean económicos, posean una acción antimicrobiana de amplio espectro y exhiban baja toxicidad.

Muchos factores influyen en la efectividad del agente, entre los más importantes cabe mencionar al alimento en sí, su actividad acuosa, la presencia de otros compuestos tales como azúcares, sales, ácidos, especias y

el nivel de contaminación inicial. Este último factor es de fundamental importancia porque el uso de un conservador no es un sustituto de adecuadas prácticas sanitarias durante el procesamiento de un alimento, por el contrario, se pueden lograr mayores beneficios cuando se combinan los efectos de ambos.

1.3.1 Acidos Orgánicos Empleados en la Industria Alimenticia

Los ácidos orgánicos más utilizados como preservadores en la industria alimenticia son los siguientes (Robach, 1980):

- . Benzoatos: el óptimo rango de pH para su actividad antimicrobiana es 2.5-4.0, debido a que entre esos valores se halla la mayor proporción de ácido no disociado, siendo efectivo, por lo tanto, en alimentos ácidos. El benzoato de sodio tiene actividad contra levaduras, hongo y bacterias pero no es recomendado usualmente contra bacterias porque su actividad decrece por arriba de pH 4.5, donde estos microorganismos constituyen el mayor problema.
- . Parabenos: es el nombre dado a los ésteres alcalinos del ácido parahidroxibenzoico; son compuestos mucho más versátiles que los otros ácidos orgánicos usados como preservadores. No son ácidos débiles y el grupo carboxílico esterificado le permite retener la molécula activa no disociada en un amplio rango de pH. La actividad antimicrobiana de los parabenos es directamente proporcional a la longitud de la cadena, pero desafortunadamente la solubilidad decrece cuando esta aumenta. En general son más activos contra hongos y levaduras y menos efectivos contra bacterias Gram-negativas. Son más caros que otros preservadores y no son solubles en agua. Su principal empleo en los productos cárnicos se debe a que son

activos en zonas de pH débilmente ácido y neutro. Su uso está indicado en aquellos productos cárnicos que contienen gelatina, pero tienen el inconveniente que aún en pequeñas concentraciones se pueden detectar por su sabor.

- . Propionatos: fueron uno de los primeros ácidos monocarboxílicos usados como agentes antimicrobianos en alimentos. Es efectivo principalmente contra hongos, pero poco sobre levaduras y bacterias. Su eficacia de pende también del pH del alimento. No ha tenido aceptación en la industria de la carne, probablemente, porque altera en forma desfavorable las características organolépticas de dichos productos.
- . Sorbatos: La acción antimicrobiana de los ácidos grasos ha sido asociada a su fracción no disociada. El sorbato es más efectivo a valores de pH cercanos a su constante de disociación (pka) que es 4.75, y es el valor en que el 50% del ácido está en la forma no disociada, Consecuentemente es más efectivo en alimentos ácidos, aunque su acción se manifiesta hasta pH comprendidos entre 6.0 y 6.5 que es superior al rango de los ácidos propiónico y benzoico. Este mayor rango de efectividad hace posible su aplicación a productos cárnicos.

1.3.2 Acido Sórbico

1.3.2.1 Efectividad como Agente Antimicrobiano en Productos Cárnicos

Gran cantidad de estudios se han llevado a cabo durante estos últimos años para examinar la eficacia del ácido sórbico y del sorbato de potasio como agentes antimicrobianos en un amplio espectro de carnes procesadas.

Originalmente el ácido sórbico fue usado para inhibir hongos y le

vaduras (Phillips y Mundt, 1950; Deuel y Col., 1954; Melnick y Col., 1954; Boyd y Tarr, 1955; Baldock y Col., 1979), pero actualmente se ha encontrado que actúa también sobre Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum, salmonelas y pseudomonas (Park y Marth, 1972; Tompkin y Col., 1974; Robach, 1978, 1979; Robach y Stateler, 1980; To y Robach, 1980; La Rocco y Martin, 1981).

Además se ha comprobado que el ácido sórbico retarda el crecimiento y producción de toxina del Clostridium botulinum en carnes curadas, permitiendo bajar los niveles de nitrito y por lo tanto reducir la formación de nitrosaminas (Ivey y Robach, 1978; Ivey y Col., 1978; Kemp y Col., 1979; Sofos y Col., 1979 a, b, c; Lueck, 1980; Sofos y Col., 1980 a, b).

El ácido sórbico es un ácido graso α,β -insaturado de cadena recta, cuya fórmula molecular es $\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$. El grupo carboxilo reacciona fácilmente formando sales y ésteres. Las sales del ácido sórbico son muy importantes, especialmente la sal de potasio, debido a su alta solubilidad en agua. A 25°C, la solubilidad del ácido en agua es 0.16% y la del sorbato de potasio es aproximadamente del 50%. A causa de la limitada solubilidad sus sales son más efectivas.

Aumentando la concentración de componentes solubles (>10%), tales como glucosa, sacarosa y ClNa , se reduce la solubilidad del ácido en agua y se incrementa el coeficiente de partición aceite-agua; por lo tanto si se eleva el contenido graso podría disminuirse la cantidad de ácido sórbico en fase acuosa donde es necesaria para el control microbiano (Sofos y Busta, 1981). Sin embargo algunos estudios indican que la sal y los azúcares actúan en forma sinergista con el sorbato (Robach y Stateler, 1980).

Las aplicaciones prácticas del sorbato incluyen alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos y materiales de envasado.

Como agente preservador de alimentos se utiliza en quesos, tortas, jugos de frutas, jarabes, mermeladas, salsas, pickles, mayonesa, margarina, semiconservas de pescado, frutas secas, etc.

Los niveles incorporados (expresados como ácido sórbico) varían entre 100 y 3000 ppm, y tanto el ácido como la sal de potasio son consideradas sustancias inocuas (GRAS: generally recognized as safe) para uso en alimentos regulados por la U.S. Food and Drug Administration.

En nuestro país, el sorbato, está autorizado en algunos alimentos y los niveles permitidos son los siguientes:

Pickles . . . 600 ppm

Salsas y
Extractos de
tomates . . . 500 ppm

Margarinas. . 1000 ppm

Mermeladas. . 1500 ppm

De acuerdo con el Handbook of Food Additives (1975) y la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1980) los niveles recomendados de sorbato para algunos alimentos son:

Quesos 500 ppm

Jugos de frutas
y sus derivados . 150 - 1000 ppm

Frutas secas . . . 200 - 500 ppm

Semiconservas
de pescado 1000 ppm

Los resultados de algunos estudios sugieren que el ácido sórbico ejerce una selectiva inhibición contra bacterias catalasa-positivas, y por lo tanto podría ser usado como agente selectivo de bacterias catala

sa - negativas, tales como bacterias ácido lácticas y clostridios. Las afirmaciones halladas en la literatura con respecto a que el ácido sórbico no tiene acción contra clostridios están basadas en ensayos realizados en medios de cultivo a pH = 7, que es el óptimo para el crecimiento de esos microorganismos; pero a ese pH el sorbato ya no es efectivo porque prácticamente está todo en la forma disociada.

El pH de la mayoría de las carnes curadas está en el rango de 5.5 a 6.5. Con la adición de sorbato de potasio a tales productos no se esperarían cambios significativos en los valores de pH inicial, mientras que la adición de ácido sórbico podría provocar un descenso de 0.2 - 0.4 unidades de pH (Sofos, 1981). El pH de los productos cárnicos puede decrecer en alguna extensión durante los estados iniciales del almacenamiento (antes que el producto comience a deteriorarse). Esto podría ser verificado, pero la alta capacidad buffer y complejidad de los productos cárnicos causa dificultades para conocer exactamente los valores de pH en todo el sistema o, para predecir fehacientemente los cambios que puede sufrir durante el almacenamiento. Experiencias más recientes han demostrado que las combinaciones de sorbato y nitrito son muy efectivas contra la producción de toxina por Cl. botulinum en productos a base de carnes rojas. Estos hallazgos indican que esos productos alcanzan valores de pH dentro del rango de la efectividad antimicrobiana del sorbato.

El nitrito reacciona con la mioglobina formando el característico color de la carne curada, tiene efecto sobre el sabor, actúa como antioxidante y lo que es más importante, retarda la producción de toxina botulínica si el producto es sometido a temperaturas abusivas.

La necesidad de minimizar la formación de nitrosaminas en productos

cárnicos mientras se mantiene su exelente seguridad antibotulínica indujo una serie de investigaciones para probar al sorbato como total o parcial reemplazante de nitrito en tales productos.

Los estudios demostraron que el sorbato (0.20%) tenía efecto en retardar la producción de toxina y además, la combinación de sorbato (0.20%) con bajos niveles de nitrito (40-80 ppm) actúa sinérgicamente, extendiendo el tiempo necesario para la producción de toxina bajo condiciones extremas (Ivey y Robach, 1978; Ivey y Col., 1978; Sofos y Col., 1979 a,b,c, 1980 a,b).

En 1979 una regulación de USDA (United States Department of Agriculture), permitió el uso de 0.26% de sorbato de potasio en combinación con 40 ppm de nitrito de sodio en tocino.

Recientes estudios realizados por USDA con tocino, para verificar la actividad antibotulínica de las combinaciones de sorbato con nitrito, revelaron que el producto provocaba reacciones alérgicas en algunos individuos. Esto ha retardado el uso de sorbato en la producción de ese producto.

Los efectos del ácido sórbico sobre las bacterias esporuladas son contradictorios. Los resultados obtenidos por algunos investigadores indican que el ácido sórbico no afecta la germinación de las esporas de Bacillus subtilis. No obstante, otros estudios han revelado que el sorbato retarda la germinación de las esporas de algunas especies de Bacillus (Sofos y Busta, 1981).

Trabajos realizados con carne picada indicaron que el ácido sórbico en concentraciones de 0.15 - 0.20%, sólo o en combinación con nitrito, inhibe la germinación de las esporas botulínicas (Sofos y Col., 1979 (a), (c); 1980 (a)). Sin embargo, algunas muestras eventualmente se tornaban tóxicas, lo que indicaría que un pequeño número de esporas podría germinar, con un posible crecimiento y producción de toxina.

El nitrito no afecta la germinación de las esporas pero ejerce su efecto durante las primeras etapas del crecimiento y antes de la producción de toxina. Los últimos estudios indican que el nitrito residual es la clave del factor antibotulínico en carnes curadas y el sorbato retarda la desaparición del nitrito residual (Sofos y Col., 1979 (d)).

Myers y Col. (1983) estudiaron el efecto del sorbato para prevenir el crecimiento de Yersinia sp. en carne de cerdo envasada al vacío; obteniendo resultados altamente satisfactorio.

El mecanismo de acción es hasta ahora desconocido, postulándose varias hipótesis para explicar el efecto preservador. Algunos autores tratan de explicar la acción del sorbato a través de la inhibición de varios sistemas enzimáticos, como por ejemplo las deshidrogenasas para la inhibición de hongos, enzimas conteniendo grupos sulfhidrilos para bacterias catalasa positivas, hongos y levaduras.

La diversidad de microorganismos inhibidos por sorbato, la variedad de enzimas afectadas y la variabilidad de resultados entre especies y aún entre cepas de la misma especie conduce a concluir que no es un simple mecanismo el responsable de la preservación por sorbato.

1.3.2.2 Toxicidad

Aguda: La LD₅₀ (Dosis letal 50%) del ácido sórbico cuando es administrado por vía oral en ratas es de 10,5 ± 1,96 g/kg de peso corporal. Otros autores citan valores de 7,4 y 8,7 g/kg de peso. La LD₅₀ del sorbato de sodio ha sido determinada entre 5,94 y 7,16. La toxicidad aguda del ácido sórbico no es alterada por la introducción de otros preservadores al mismo tiempo en la alimentación de los animales experimentales. El ácido sórbico irrita las membranas mucosas, pero solamente en personas altamen

te sensitivas causa irritación en la piel intacta (Lueck, 1980).

Subcrónica: la administración de un 10% de ácido sórbico fue tolerado por ratas durante 42 días sin provocar daños. En otra experiencia del mismo tipo pero llevada a cabo por un período de 120 día produjo un incremento del crecimiento y un mayor peso del hígado. El funcionamiento reproductivo de los animales permanece normal. La adición del 5% del ácido sórbico al alimento de ratas y perros no produjo daños durante los 90 días que duró el ensayo; igualmente el 8% del ácido sórbico, que representaba 5 g/kg de peso corporal, causaba solamente un ligero aumento en el peso del hígado sin cambios histológicos; ese incremento observado ocasionalmente es interpretado como una hipertrofia funcional, atribuible a la utilización calórica del ácido sórbico.

El sorbato de potasio no tiene acción mutagénica o teratogénica (Lueck, 1980).

Crónica: el ácido sórbico incorporado a la alimentación diaria de ratas y ratones en cantidades de 40 a 90 mg/kg de peso corporal no produce efectos desfavorables. En otro ensayo continuado durante dos años, la alimentación administrada a las ratas contenía 1,5% y en otros casos 10% de ácido sórbico.

En los animales a los que se les suministró concentraciones más bajas no se observaron anormalidades. La adición del 10% provocó un ligero incremento de peso y también un agrandamiento de la glándula tiroides, del hígado y del riñón.

El ácido sórbico y el sorbato de potasio no tienen acción carcinogénica (Lueck, 1980).

1.4 Objetivos

La incidencia que tienen las carnes bovinas argentinas industrializadas para la economía del país es ampliamente conocida. Al respecto, debe mencionarse el alto consumo por habitante y por año mantenido por Argentina en los últimos años lo que nos convierte en uno de los países de más alto índice en el mundo (Tabla 1).

Tabla 1: Consumo Anual de Carne Vacuna en kg por Habitante

PRODUCTO	1978	1979	1980	1981	1982
Vacuna	90,5	84,8	85,8	85,0	71,3
Ovina	3,3	3,6	3,3	3,2	3,0
Porcina	7,9	9,4	9,5	8,8	8,0
TOTAL	101,7	97,8	98,6	97,0	82,3

Fuente: Junta Nacional de Carnes

Desde el punto de vista de las exportaciones, éstas son del orden de 475.000 toneladas por valor de 920 millones de dólares en el período 1978/82 lo que indica el peso del rubro carnes, menudencias y extracto en el comercio exterior argentino (la inclusión de subproductos llevaría la cifra promedio a 1.360 millones de dólares, lo que significaría el 17,7% del monto total de las exportaciones argentinas en el período).

Si bien el espectro de productos frigoríficos exportados es extremadamente amplio (carnes refrigeradas y congeladas, cocidas congeladas, enlatadas, saladas, menudencias, extracto, subproductos, etc.) las carnes refrigeradas y congeladas involucran un importante rubro.

Las exportaciones de carnes bovinas enfriadas y congeladas señalan un monto promedio de 697 millones de dólares para carne bovina, lo que significa el 75.76% de los montos correspondientes al total de carnes, menudencias y extractos mencionado anteriormente.

A principios de la década del 70, Argentina comenzó a retroceder en la lista de exportadores mundiales de carne quedando detrás de Australia; diez años más tarde fue desplazada por la Comunidad Económica Europea y hacia 1983, Brasil la ha desplazado al cuarto sitio.

Durante el período 1982-1983 los principales mercados de carnes refrigeradas y congeladas argentinas fueron: Mercado Común Europeo, Unión Soviética, Israel, Japón, países africanos, ALADI.

Debe señalarse que el precio de venta de las carnes bovinas refrigeradas es superior al de las carnes congeladas; de acuerdo a las estadísticas de la Junta Nacional de Carnes (1982) el precio para cortes refrigerados fue de 3.340 dólares/ton., mientras que el equivalente de cortes congelados fue de 2.156 dólares/ton y el de cuartos congelados 1.640 dólares/ton.

Esto subraya la necesidad de incrementar las exportaciones de carnes refrigeradas que constituyen un producto de alto valor económico. Lamentablemente, los clásicos mercados exteriores donde Argentina llegaba a través de sus carnes refrigeradas han ido disminuyendo la participación argentina, a raíz de los avances tecnológicos experimentados por otros países en materia de envasado y preservación de cortes de carne refrigerados. Esto ha permitido que países excesivamente alejados de esos mercados puedan acceder en condiciones competitivas. Consecuentemente, la Argentina ha dirigido sus ventas hacia nuevos mercados. La satisfacción de los requerimientos que éstos plantean así como el posible ingreso a otros

mercados no tradicionales conduce a la necesidad de nuevos desarrollos y nuevas tecnologías.

Las exportaciones de carnes argentinas muestran una consistente tendencia a incrementar el valor agregado. Es así que de las exportaciones de ganado en pie se pasó a las medias reses, cuartos y últimamente cortes y porciones congeladas . Esta evolución debe acentuarse incorporando los envases adecuados que permitan acceder a los mercados de ultramar con óptima calidad.

Desde el punto de vista del consumo interno, la tendencia mundial es la implementación de centrales de empaque que permitan el envío de los cortes envasados, preparados para la venta minorista. En este aspecto, el envasado al vacío en películas de baja permeabilidad constituye un procedimiento adecuado ya que prolonga significativamente la vida útil del producto. Nuestro país tiende a la aplicación de estos sistemas, más higiénicos y seguros para la venta de carnes y requeriría entonces, el conocimiento de las causas y velocidad de alteración de los productos.

La problemática descripta ha originado el presente trabajo, cuyos objetivos son los siguientes:

- . Analizar la flora microbiana que desarrolla en carne bovina refrigerada, envasada en películas plásticas de distinta permeabilidad a gases.
- . Establecer la vida útil de la carne en términos de la temperatura , permeabilidad al oxígeno del envase, contaminación inicial y pH del músculo.
- . Determinar los parámetros cinéticos (velocidad de crecimiento y tiempo de latencia) de cada uno de los microorganismos que constituyen la flora microbiana predominante en las diferentes condiciones de almacenamiento.

cenamiento.

- . Desarrollar ecuaciones matemáticas que permitan cuantificar el crecimiento bacteriano en función de los parámetros cinéticos y de la contaminación inicial.
- . Interpretar las modificaciones de la atmósfera gaseosa del interior de los envases al vacío a través de balances de materia que contemplen los parámetros bioquímicos intrínsecos de la carne.
- . Analizar la influencia del sorbato de potasio como agente antimicrobiano en carne refrigerada con el objeto de extender los períodos de almacenamiento de la misma.
- . Interpretar los mecanismos de acción inhibitoria del ácido sórbico, en función del pH del medio.
- . Estimar los niveles residuales de preservador que proporcionen un máximo de inhibición microbiana compatible con el mantenimiento de los atributos de calidad de la carne.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1 Materia Prima

Se realizaron experiencias de almacenamiento de carne bovina refrigerada a dos niveles de temperatura ($0^{\circ} \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ y $4^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$), utilizando para el envase dos películas plásticas de distinta permeabilidad al oxígeno.

2.1.1 Músculo Carne

El músculo seleccionado para el estudio fue el semitendinoso de ganado bovino, obtenido de novillos clasificados como U₂ grado A de acuerdo a la Junta Nacional de Carnes (peso promedio de la res 240 kg); con un tiempo post-mortem de 48 hs a 5°C.

2.1.2 Películas Plásticas : propiedades

Las películas empleadas fueron polietileno de baja densidad y una película coextrudada compuesta por EVA-SARAN-EVA; esta última fue provista por la empresa Darex S.A.I.C. y su nombre comercial es Super Cryovac. SARAN es un copolímero de cloruro de vinilo y cloruro de vinilideno y EVA es un polímero de etil-vinil acetato. Las propiedades de las mismas se indican en la Tabla 2.

Tabla 2 : Propiedades de las Películas de Envasado

	EVA-SARAN-EVA	POLIETILENO
Permeabilidad al O ₂ (cm ³ /m ² /24 hs/1 atm/23°C)	50.0	5000
Permeabilidad al CO ₂ (cm ³ /m ² /24 hs/1 atm/23°C)	105	—
Transmisión del vapor de agua (gr/m ² /24 hs/78%/HR/30°C)	7.2	12
Espesor (μ)	60	60

La permeabilidad al oxígeno de las películas decrece a bajas temperaturas, siguiendo la relación de Arrhenius (Eustace, 1981). La energía de activación para la permeación de O_2 en polietileno de baja densidad es 10 Kcal/mol y para la película compuesta es de 14 Kcal/mol.

2.2 Técnica de Envasado

El músculo fue seccionado en rodajas, cortadas en dirección transversal a las fibras, de 1.5 cm de espesor y 10 cm de diámetro (peso aproximado 117 g). Las muestras fueron envasadas bajo vacío utilizando un equipo Minidual, de envases flexibles termosellables por el sistema de cámara simple, alcanzándose una presión residual en la campana de 4.5 mm de Hg.

2.2.1 Medición de la Presión Interior del Envase

La presión interior del envase fue medida siguiendo el método de Seideman y Col. (1976). Las muestras envasadas se colocaron en una jarra de anaerobiosis (Oxoid) que fue evacuada gradualmente, determinando por lectura manométrica la presión a la cual la película se despegaba de la carne; en ese momento la presión de la jarra igualaba la del interior del envase.

2.2.2 Termocontracción de la Película

La termocontracción de la película de EVA-SARAN-EVA se realizó sumergiendo los envases en un baño de agua a 84°C durante 1 seg. Este proceso permite, por medio del calor, que desaparezcan los pliegues y arrugas, mejorando el aspecto del envase. La influencia de la termocontracción fue analizada envasando diez rodajas pertenecientes a un mismo músculo en EVA-SARAN-EVA, de éstas, cinco fueron termocontraídas y el resto no se sometió a ningún tratamiento, determinándose en ambos casos recuentos aeróbicos. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado.

2.3 Almacenamiento

La temperatura de almacenamiento de las cámaras fue controlada por medio de termocuplas colocadas dentro de las rodajas de carne registrando los valores en un Data Logger Fluke, 2240-C.

A distintos intervalos de tiempo se tomaron muestras realizándose las siguientes determinaciones: pH con un electrodo para carne Ingold LOT 405-M4, análisis microbiológicos, medición del color y de las concentraciones relativas de gases en la atmósfera interior de los envases.

Cada período de almacenamiento se llevó a cabo, como mínimo, con cuatro músculos provenientes de diferentes animales para observar la influencia de la contaminación inicial, pH y variabilidad biológica. Estos períodos se daban por terminados cuando los recuentos microbianos aeróbicos alcanzaban valores de $10^7/\text{cm}^2$. De acuerdo a la literatura a partir de esos valores el deterioro comienza a hacerse evidente (Ayres, 1960).

2.4 Técnica de Muestreo para Recuentos Microbianos

2.4.1 Localización de las Bacterias en el Tejido

Aunque es obvio que el crecimiento microbiano ocurre sobre la superficie de la carne, la posibilidad de actividad bacteriana en el interior de la misma debe ser considerada.

La invasión de las bacterias intestinales no ocurre durante el sacrificio y la invasión post-mortem sólo se manifiesta luego de muchas horas después de la muerte cuando la autólisis provoca la ruptura del estómago liberando el contenido intestinal en la cavidad corporal (Gill, 1982).

En los animales que son sacrificados por desangrado, hay un período luego del aturdimiento durante el cual las bacterias se introducen en el flujo sanguíneo por los implementos utilizados en la matanza y podrían di

seminarse en los tejidos a través de la circulación de la sangre. La importancia, del relativo pequeño número de microorganismos que pueden entrar por este método dependerá de la extensión en que son eliminados por los mecanismos de defensa inmunológica que persisten después de la muerte.

Existen distintas opiniones con respecto a la habilidad de las bacterias para penetrar en el tejido desde la superficie de la carne. Una sostiene que las bacterias, mesófilas pueden penetrar 10 a 15 cm en la carne al cabo de 2 días, aún a temperaturas por debajo de cero. Sin embargo, otros autores observaron que las bacterias no podrían ser detectadas a profundidades mayores que 2 cm en carne normal mantenida a temperatura ambiente.

Durante la mayor parte del período de crecimiento los microorganismos están confinados a la superficie. La inoculación superficial de bloques de carne estériles demostró que especies no proteolíticas fueron incapaces de penetrar y que las proteolíticas únicamente lo lograron hacia el final de la fase de crecimiento logarítmico, cuando la carne está en un avanzado estado de deterioro y comenzaron a producirse las enzimas proteolíticas. No se requiere movilidad para que ocurra la penetración; aunque la producción de exoenzimas es claramente necesaria, estudios realizados a través de micrografías no mostraron evidencias de un extensivo daño del tejido. Las bacterias se diseminan en la región comprendida entre las fibras musculares y los alrededores de la capa de tejido conectivo.

El endomisio es una fina envoltura de material colagenoso que rodea cada fibra muscular. Para la penetración bacteriana es necesario la rotura de esta estructura por proteasas bacterianas (Gill y Penney, 1977) pero Sikes y Maxcy (1980) señalaron que las proteasas bacterianas tenían poca o ninguna actividad colagenolítica. El endomisio es esencialmente el basamento de las membranas de las células musculares y está compuesto por una sus

tancia base amorfa conteniendo finas fibras de colágeno (Gould, 1973). La sustancia base está formada por una red de moléculas de colágeno y glucoproteínas, pero las moléculas de colágeno contienen regiones no helicoidales que son realmente susceptibles al ataque proteolítico.

Las micrografías obtenidas por Gill y Penney (1982) revelaron que la sustancia base es degradada, pero que las finas capas de colágeno unidas a la estructura endomisial visible son refractarias al ataque proteolítico. El área preferida de invasión parece ser entre las fibras musculares y las capas de colágeno.

Las fibras musculares sufren aparentemente un encogimiento radial durante el desarrollo del rigor-mortis pudiendo separarse, entonces, el endomisio que las rodea. Gill y Col. (1984) demostraron que la penetración bacteriana se realiza a través de esas brechas que se producen entre los elementos contráctiles de las células musculares y el endomisio circundante.

Diversos trabajos han evidenciado que invariablemente el interior del músculo es estéril, ya sea que el sacrificio se haya realizado en condiciones experimentales o comerciales (Gill, 1982).

En base a lo expuesto, la toma de muestra se llevó a cabo en superficie; la inclusión en la muestra, de relativamente grandes cantidades de material no contaminado del centro del músculo reducirían la sensibilidad de los análisis y no indicarían la verdadera contaminación.

La evaluación microbiológica de la carne se realizó cortando del borde de las rodajas (que corresponde a la superficie externa del músculo), una superficie de 20 cm^2 y de 0,3 cm de espesor, aproximadamente. Estos cortes se practicaban con un bisturí estéril.

2.4.2 Mecanismos de Adhesión Bacteriana a la Superficie de la Carne y su Influencia sobre el Método de Conteo

Numerosos procedimientos han sido descriptos para enumerar las poblaciones microbianas sobre superficies cárnicas; estos se pueden clasificar en dos grupos: destructivos y no destructivos. En el método destructivo, una muestra de tamaño determinado es cortada y mezclada, macerada o digerida con un diluyente estéril antes de que se realicen las siembras para el recuento de las colonias. Los métodos no destructivos incluyen el lavado, frotado, enjuagado o contacto directo con una placa de agar. Los resultados obtenidos por ambos métodos no son comparables, produciéndose recuentos menores en el caso de utilizar una técnica no destructiva (Baldock, 1974; Niskanen y Pohja, 1977; Butler y Col., 1979; Notermans y Col., 1979). De acuerdo con los estudios realizados por algunos investigadores (Butler y Col., 1979; Notermans y Col., 1979) la adhesión de los microorganismos a la superficie de la carne explica las diferencias entre esos dos métodos.

El mecanismo de unión de las bacterias involucra dos estados consecutivos. En el primer estado, se produce una absorción reversible donde las bacterias son atraídas y mantenidas débilmente cerca de la superficie; exhiben un movimiento Browniano y pueden ser removidas por lavado. En esta fase están involucradas fuerzas físicas; las fuerzas atractivas de London - van der Waals son contrarrestadas por los efectos repulsivos de la atmósfera iónica (doble capa difusa) que se encuentra en la superficie. Las bacterias están mantenidas, por lo tanto, en un punto de mínima fuerza neta a una pequeña, pero finita distancia de la superficie. La separación tiende a incrementarse con el decrecimiento de la concentración electrolítica.

En el segundo estado, se produce una absorción irreversible que desarrolla con el tiempo. Las bacterias llegan a adherirse firmemente a la superficie, no presentan movimiento Browniano y no pueden ser removidas por lavado. Esta fase se caracteriza por la formación de polímeros viscosos (po

lisacáridos extracelulares) que pudieron ser vistos a través del microscopio electrónico.

Las bacterias se fijan a la superficie por medio de una enredada masa de fibras de polisacáridos o moléculas de azúcar ramificadas que se extienden desde la superficie bacteriana y forman una red que rodea a la célula o colonia. La masa fibrosa bacteriana fue ignorada durante mucho tiempo por la tendencia de trabajar con cultivos puros en medios de laboratorio; en tales condiciones las bacterias no necesitan fabricar esas fibras. La red posiciona a las bacterias en la superficie, conduce nutrientes hacia ellas, concentra y conserva enzimas digestivas secretadas por las mismas.

El mecanismo de adhesión es indudablemente muy complejo y solamente algunos aspectos son conocidos. El número de bacterias adheridas depende del tipo de superficie cárnica y de la cepa bacteriana, encontrándose que cepas de Pseudomonas se unen a las superficies cárnicas más rápidamente que otras bacterias (Firstenberg - Eden y Col., 1978; Butler y Col., 1979).

Existen distintas opiniones con respecto al rol que desempeñan los flagelos en el proceso de unión. Butler y Col. (1979) encontraron que, en general la unión de especies móviles, Gram-negativas, fue mayor que la correspondiente a organismos inmóviles, Gram-negativos. Sin embargo, Notermans y Col. (1979) observaron una mejor adhesión por parte de S. aureus que con los flagelados Escherichia coli y Salmonella.

La importancia de los flagelos no puede ser juzgada comparando cepas de bacterias diferentes, debido a que la unión depende también de otros factores como la habilidad de producir limo y de las propiedades físico químicas de la superficie de la carne.

Las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de muestreo dependen del propósito del análisis. Sin embargo, si se ha usado un método de lavado podrían contarse sólo aquellas bacterias que están débilmente unidas, y en consecuencia, no sólo serían distintos los recuentos sino además, el tipo de flora podría variar dado que la que está mejor adherida no se detectaría. En base a estas conclusiones se utilizó un método destructivo para poder determinar el número y flora real de la carne.

Las muestras obtenidas (20 cm^2) se colocaron en Erlenmeyers que contenían 180 ml de peptona (Oxoid) al 0.1 %, con perlas de vidrio, y se agitaban durante 15 minutos en un agitador rotatorio a 250 rpm y a una temperatura de 30°C . A partir de esta suspensión se hacían las diluciones adecuadas en peptona 0.1% sembrándose 0.1 ó 1.0 ml en cajas de Petri; el volumen dependía de la cantidad de gérmenes presumiblemente presentes. En el caso de usar 0.1 ml se empleó la técnica de siembra en superficie y 1.0 ml para la de profundidad. En lo posible, se utilizó con preferencia la siembra en superficie dado que esto también afecta el número de bacterias recuperadas.

Cada dilución era sembrada por triplicado y para realizar los recuentos se empleó un cuenta colonias Ionomex.

2.4.3 Distribución de la Población Microbiana

Los niveles microbianos reales están distribuidos en forma normal logarítmica y los resultados obtenidos de las unidades de muestreo estarían distribuidos alrededor de la media logarítmica del recuento ($\overline{\log N}$) (Kilsby y Pugh, 1981). Esa media es menor que el logaritmo del recuento promedio porque la relación entre la media logarítmica y el logaritmo medio (logaritmo del promedio del recuento exacto) está definido por:

$$\log \bar{N} = \overline{\log N} + \log S^2/10$$

donde $\log \bar{N} = \log$ medio

$\overline{\log N}$ = media logarítmica

S^2 = varianza del logaritmo de los recuentos

Un método simple para reducir la varianza es el incremento del tamaño de la unidad de muestra analizada. Generalmente se usan entre 10 y 25 g de alimento para análisis con el objeto de garantizar un buen mezclado; por esto, la variabilidad entre alícuotas tomadas de una misma preparación es muy baja.

La distribución de los microorganismos sobre carnes procesados depende directamente del proceso aplicado y de la manipulación que el producto ha recibido.

Los recuentos se expresaron como $\log \text{UFC}/\text{cm}^2$.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

Para establecer el número de rodajas de carne necesarias, para que los resultados de cada toma de muestra sean representativos del músculo entero, se determinó la variación de la contaminación a lo largo del mismo.

Los recuentos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, llegándose a la conclusión que la variación de la contaminación a lo largo del músculo no es significativa y, por lo tanto, se lo puede considerar como un bloque homogéneo (Apéndice 1, Tabla I).

2.5 Selección de Medios de Cultivo para Recuentos Microbianos

2.5.1 Recuento Aerobio

Se utilizó Plate Count Agar (PCA; Oxoid) con una incubación de 2 días a 30°C.

Los organismos que deterioran la carne fresca son capaces de crecer a

temperaturas de refrigeración y por lo tanto su máxima temperatura de crecimiento podría ser inferior a 32-33°C, no siendo detectados sobre placas incubadas a 35-37°C. Los recuentos obtenidos a esas temperaturas no serían un adecuado reflejo del verdadero contenido microbiano del producto. Un considerable número de estudios han mostrado que existe una pequeña diferencia en los recuentos obtenidos a temperaturas entre 1 y 30°C, pero la diferencia es significativa entre esas temperaturas de incubación y 35-37°C (Ingram y Roberts, 1976). La temperatura más usada, para obtener información en un tiempo razonable, está comprendida en el rango de 20-30°C (Kitchell y Col., 1973).

Noskova (1972) cita como temperatura óptima de crecimiento de las cepas psicrótrofos de Pseudomonas el rango comprendido entre 25 y 30°C.

De acuerdo a lo antedicho se eligió 30°C como temperatura de incubación teniendo un estricto control para impedir que se supere ese valor.

2.5.2 Recuento Anaerobio

Plate Count Agar (Oxoid)

(PCA) - Incubación: 3 días a 30°C en jarra de anaerobiosis (Oxoid)

2.5.3 Pseudomonas

- Bacto - Pseudomonas Agar F (Difco). Incubación: 2 días a 30°C. Este medio de cultivo se empleó para la detección de pseudomonas fluorescentes.

- Medio Masurovsky (Masurovsky y Col., 1963), cuya composición es:
(expresado en g/1000 ml de agua destilada)

NH ₄ NO ₃	5.0
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.015
L-Arginina HCl	10.0

Extracto de levadura	0.25
Mg SO ₄ .7H ₂ O	1.0
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O	0.1
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	0.8
Rojo Cresol	0.2
Agar	12.15

pH: 7.2 ± 0.2

En el momento de usarlo se incorporan los siguientes antibióticos:

Eritromicina	5 µg/ml
Cloranfenicol	2.5 µg/ml

Incubación: 2 días a 30°C

2.5.4 B. thermosphacta

Medio S.T.A.A.(Gardner, 1966).

(Streptomycin Sulphate Thallous Acetate Actidione Agar)

Composición (expresada en g/100 ml de agua destilada)

Peptona	2
Extracto de levadura	0.2
Glicerol	1.5
K ₂ HPO ₄	0.1
Mg SO ₄ .7H ₂ O	0.1
Agar	1.3

pH: 7.0

Sulfato de estreptomicina	500 µg/ml
Acetato de talio	50 µg/ml
Actidione	50 µg/ml
(Cicloheximida)	

Incubación: 2 días a 22°C

2.5.5 Lactobacilos

M.R.S. agar (Oxoid)

(de Man, Rogosa, Sharpe)

Incubación: 3 días a 30°C

2.5.6 Enterobacteriaceae

Violet Red Bile Dextrosa agar (Oxoid)

Incubación: 2 días a 30°C

2.5.7 Levaduras

Wort agar (Oxoid)

Incubación: 2 días a 30°C

2.5.8 Detección de S. aureus

Baird - Parker Medium (Oxoid)

Incubación: 2 días a 30°C

2.5.9 Detección de Salmonella

Lactose Broth (Oxoid)

Incubación: 1 día a 30°C

Mannitol Selenite Broth Base (Oxoid)

Incubación: 1 día a 30°C

Brilliant Green Agar (Oxoid)

Salmonella Shigella Agar (S.S.) (Oxoid)

Incubación: 1 a 2 días a 30°C

Generalmente se recomienda, además del caldo selenito, el empleo de caldo tetratiónato. Este último no se usó porque el microorganismo no es crítico y además por razones económicas.

2.6 Identificación de Bacterias

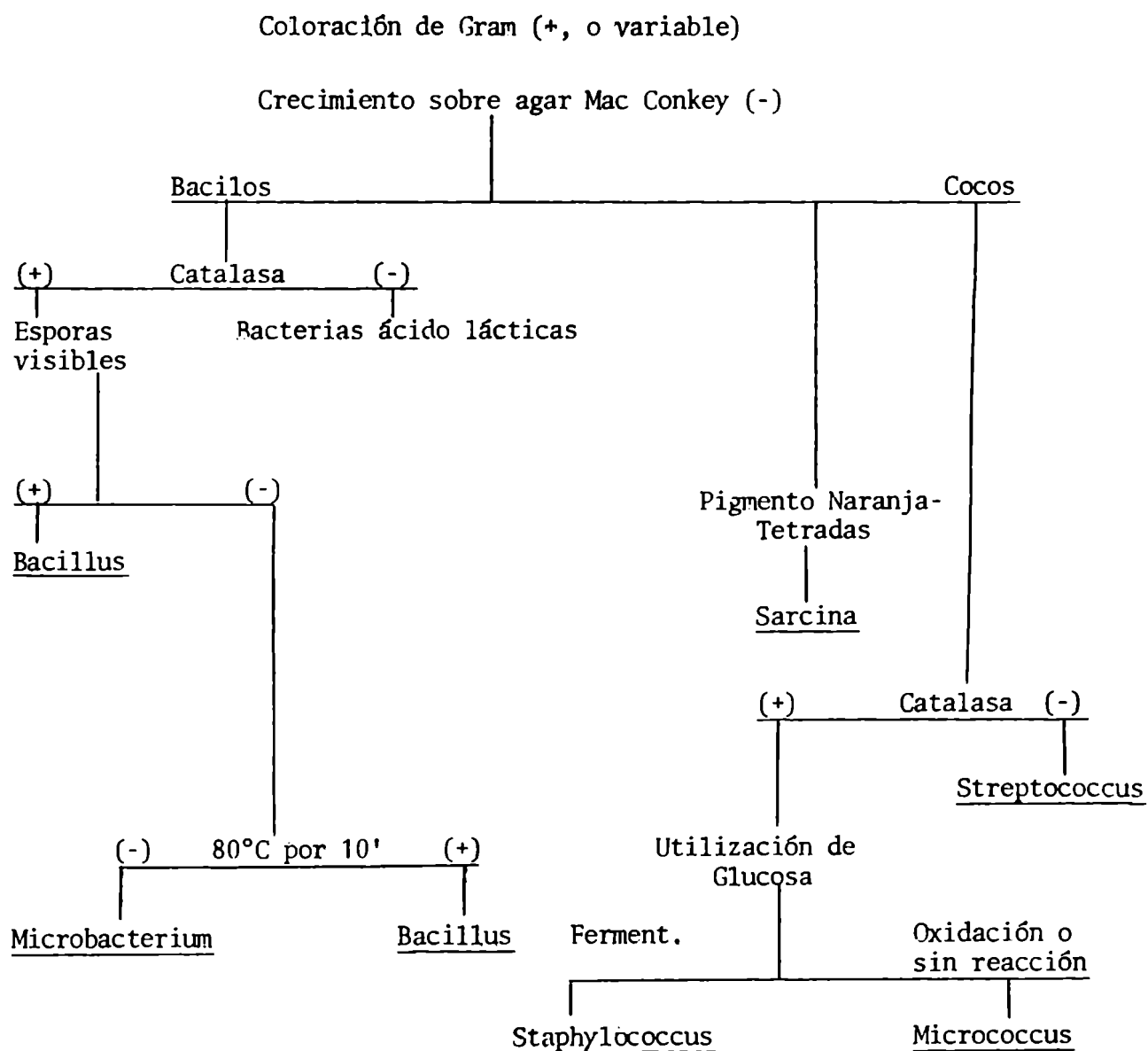
Para determinar la distribución de la microflora y su evolución durante el almacenamiento al vacío, se aislaron (al principio y al final de cada período) 20 colonias de las placas correspondientes a los recuentos aeróbi-

cos y aproximadamente 5 colonias de cada medio selectivo.

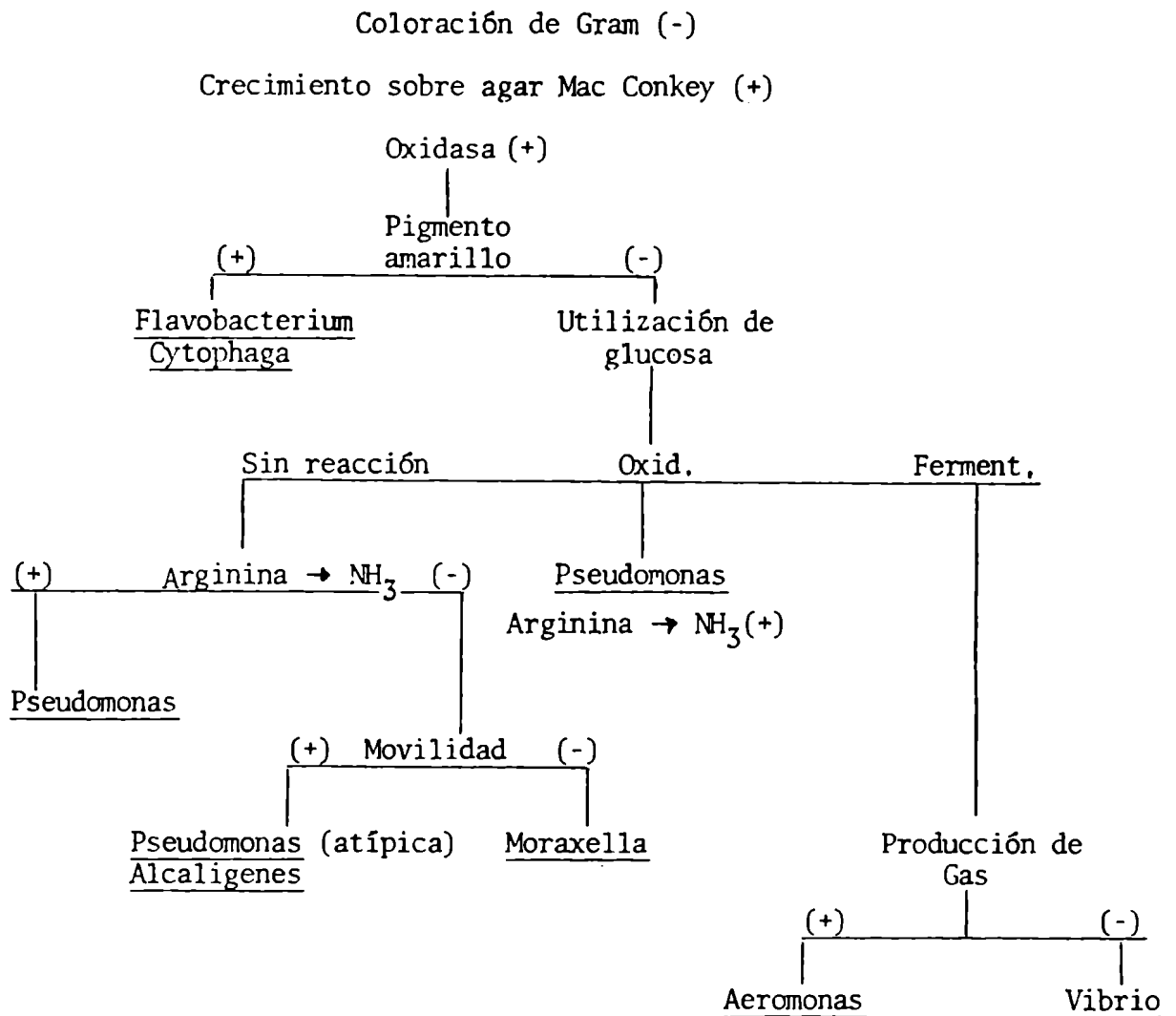
2.6.1 Esquemas de Identificación

La identificación de los microorganismos se realizó de acuerdo a los siguientes esquemas (Vanderzant y Nickelson, 1969; Dainty y col., 1979):

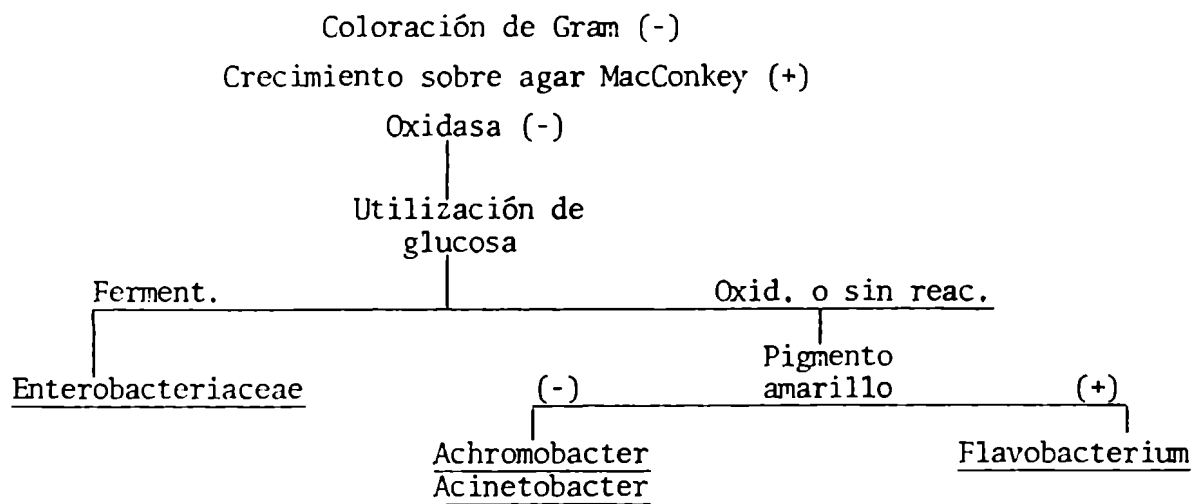
a) Bacterias Gram-Positivas



b) Bacterias Gram-negativas - oxidasa - positivas



c) Bacterias Gram-negativas-oxidasa-negativas



Los ensayos de identificación efectuados son los siguientes:

- Coloración de Gram: Equipos Britania
- Crecimiento sobre Mac Conkey Agar (Oxoid) - Incubación: 1 a 2 días a 30°C.

Esta determinación se llevó a cabo cuando la coloración de Gram era dudosa.

- Investigación de oxidasa: solución acuosa de tetrametil p-fenilendiamina al 1% sobre papel de filtro (Kovacs, 1956).
- Investigación de catalasa: solución de H_2O_2 al 3% ($H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} H_2O + O_2$).
- Producción de NH_3 a partir de arginina a través de la enzima arginina hidrolasa (Arginina $\rightarrow NH_3$; Thornley, 1960).
- Utilización de glucosa (Hugh - Leifson, 1953): metabolismo oxidativo o fermentativo.
- Test de movilidad: inoculación por punción en un medio semi sólido.
- Producción de gas: fue observada en un medio de cultivo líquido, por inclusión en el tubo de una campana de Durham.
- Esporulados: sometimiento al calor (80°C durante 10' y desarrollo sobre PCA.

2.6.2 Detección de S. aureus

Las colonias sospechosas que crecían sobre el medio Baird-Parker fueron repicadas sobre DNase agar (Oxoid). Incubación 1 a 2 días a 30°C. Este medio permite visualizar la despolimerización del DNA a través de la dexasiribonucleasa producida por este microorganismo.

2.6.3 Identificación de Enterobacteriaceae

Para realizar la identificación de enterobacterias y detectar la pre

Presencia de salmonelas las colonias que desarrollaban sobre agar S.S., Brilliant Green y Violet Red Bile Dextrosa fueron repicadas sobre los medios que se detallan a continuación:

- . Triple Sugar Iron Agar (Oxoid). Siembra en tubos con agar inclinado. Incubación 1 a 2 días a 30°C.

Es un medio compuesto que diferencia enterobacterias de acuerdo a su habilidad para fermentar lactosa, sacarosa y dextrosa, y producir H_2S .

- . Urea Agar Base (Oxoid). Siembra en tubos con agar inclinado. Incubación 1 día a 30°C. Hidrólisis de la urea a través de la enzima ureasa.

- . Kohn Two . Tube Medium (Oxoid)

Medio N°1: Siembra en tubos con agar inclinado. Incubación 1 día a 30°C. Fermentación de dextrosa, manitol y producción de ureasa.

Medio N°2: Siembra en tubos con agar vertical. Incubación 1 día a 30°C. Fermentación de sacarosa y salicina, movilidad, producción de H_2S y formación de indol.

- . Lysine Iron Agar (Oxoid). Siembra en tubos con agar inclinado. Incubación 1 día a 30°C. Hidrólisis de lisina por medio de la lisina descarboxilasa y producción de H_2S .

Estas pruebas bioquímicas fueron suplementadas con la utilización de un equipo Inolex Enteric 20 para la identificación de Enterobacteriaceae, que incluye las siguientes reacciones:

Utilización de malonato

Fermentación de glucosa

Fenilalanina desaminasa

β -galactosidasa

Producción de indol

Producción de H_2S

Lisina descarboxilasa

Ornitina descarboxilasa

Ureasa

Utilización de sacarosa

Arginina di-hidrolasa

Utilización de citrato

Fermentaciones de azúcares: salicina, adonitol, inositol, sorbitol, arabinosa, maltosa, trehalosa y xilosa.

Estos equipos fueron controlados con microorganismos testigos para verificar el estado de las reacciones; las bacterias utilizadas fueron.

Escherichia coli, Proteus vulgaris y Klebsiella pneumoniae.

La interpretación de los resultados se realizó por medio del manual Var-ident-20, que a través de un método estadístico permite la correcta identificación de los microorganismos investigados.

2.7 Medición de la Coloración Superficial

Las mediciones colorimétricas de las muestras de carne se llevaron a cabo con un colorímetro de superficie Hunter Lab D 25-A3.

El colorímetro consta de dos secciones; el sensor óptico y el procesador de señal.

En el sensor óptico, la luz de una lámpara halógena de cuarzo es dirigida a la muestra a un ángulo de 45° de la perpendicular y el receptor de luz está colocado directamente sobre el objeto.

Las señales eléctricas analógicas de los detectores llegan al procesador de señal que las convierte en especificación de color a través de los valores L, a, b, que se leen en forma digital.

El color es descripto a través de la luminosidad L y la cromaticidad

dada por los parámetros a y b. L varía desde 100 para un blanco perfecto a cero para el negro.

a representa	rojo cuando es positivo
	gris cuando es cero
	verde cuando es negativo
b representa	amarillo cuando es positivo
	gris cuando es cero
	azul cuando es negativo

2.8 Determinación de la composición de la atmósfera gaseosa

La determinación de la composición de la microatmósfera gaseosa del interior de los envases (porcentajes de O_2 , CO_2 y N_2) se realizó utilizando un cromatógrafo de gases marca Shimadzu GC-6A y procesador de datos Cromatopac C-R 1A.

La técnica utilizada por Karel (1963), fue modificada en el presente trabajo.

Se conectaron en serie de acuerdo al esquema de la Fig. 1 una columna de sílica gel (Tamiz 30-60) de 1 m de longitud, operando a $115^{\circ}C$ dentro del horno del cromatógrafo y una columna de tamiz molecular 5A (tamiz 30-60) de 2 m de longitud ubicada exteriormente y operando a $0^{\circ}C$.

Se utilizó detector de conductividad térmica y un caudal de H_2 (gas portador) de $40\text{ cm}^3/\text{min}$.

La primera de las columnas se utiliza para separar dióxido de carbono de oxígeno y nitrógeno y la segunda rellena con zeolita sintética permite separar oxígeno de nitrógeno. La polaridad del detector se invierte después de la aparición del pico de CO_2 .

La composición de la atmósfera gaseosa fue realizada en portamuestras

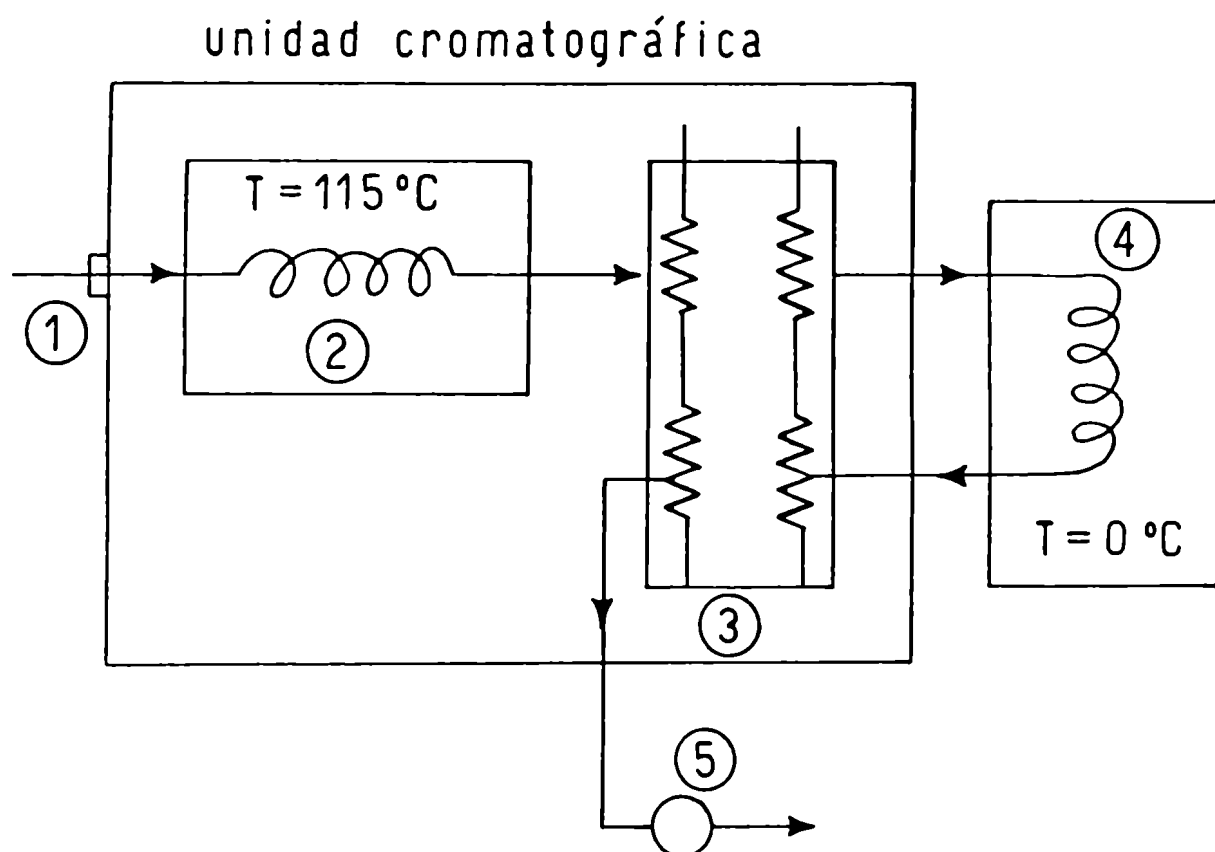


Fig. 1: Esquema de la disposición de las columnas cromatográficas.

- 1- punto de inyección de muestra
- 2- columna de sílica gel
- 3- detector de conductividad térmica
- 4- columna de tamiz molecular
- 5- caudalímetro

cilíndricos (5.5 cm de alto y 3.8 cm de diámetro) abiertos en una de sus bases; estos fueron recubiertos con la película de EVA-SARAN-EVA, evacuados hasta una presión de 4.5 mm Hg y termosellados.

La relación volumen de espacio gaseoso a volumen de carne fue de 0.8.

Las muestras gaseosas eran inyectadas al equipo con jeringa para gases con válvula de retención (Precisión Sampling A-2. Volúmen máximo: 25 μ l).

Operando bajo las condiciones experimentales descriptas los tiempos medios de retención para los distintos gases eran: $\text{CO}_2 = 0.82 \text{ min}$, $\text{O}_2 = 1.32 \text{ min}$ $\text{N}_2 = 3.48 \text{ min}$.

2.9 Soluciones preservadoras

Con el objeto de extender el período de almacenamiento de las carnes envasadas y refrigeradas, se probó el uso de sorbato de potasio, ya que es un preservador químico que ha mostrado ser efectivo en inhibir el crecimiento microbio en productos cárnicos. Por esta razón se seleccionó el sorbato de potasio.

2.9.1 Técnica de Aplicación

Las soluciones empleadas abarcan un amplio rango de concentraciones comprendidas entre el 0.20% y el 10.0%.

Las rodajas de carne fueron rociadas utilizándose 12,5 ml de solución sobre muestras de 117 g y un área de 200 cm^2 aproximadamente, lo que equivale a 0,11 ml/g ó 0.06 ml/cm^2 , dejándolas escurrir 30 seg antes de envasar. El control fue rociado con agua destilada estéril.

Se respetaron las condiciones de envasado, temperaturas de almacenamiento y criterio acerca de los períodos de vida útil mencionados para las experiencias sin aplicación de preservador, realizándose además las mismas determinaciones microbiológicas para poder comparar la acción del sorbato de potasio sobre los distintos microorganismos.

2.9.2 Dosaje de Acido Sórbito en Carne

El dosaje de sorbato en carne se determinó por espectrofotometría ultravioleta, utilizando una extracción con éter etílico en medio ácido, de acuerdo al método de la A.O.A.C. (1980). Se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu digital UV-visible y la absorbancia se determinó a una longitud de onda de 250 nm. El dosaje se realizó durante el almacenamiento y al final del mismo, sobre carne cruda y cocida; las concentraciones totales de sorbato fueron expresadas como ácido sórbico.

2.9.3 Determinación del Efecto Antimicrobiano del Sorbato de Potasio en Medios de Cultivo

El estudio de la acción inhibidora del sorbato de potasio se complementó utilizando medios de cultivos suplementados con el preservador.

Se utilizó PCA (Oxoid) con el agregado de sorbato de potasio en un rango de concentraciones de 0.025% hasta 0.6%, y se ajustó el pH con HCl (1 N) a tres niveles 5.60, 5.90 y 6.10.

El medio de cultivo preparado de esta forma se autoclavó durante 15' a 121°C, de acuerdo con la técnica aplicada por Blocher y Col. (1982). Estos autores no observaron diferencias significativas entre los recuentos obtenidos empleando esta metodología o cuando el sorbato era previamente esterilizado por filtración.

Las siembras se efectuaron en superficie, a partir de las suspensiones preparadas para hacer los recuentos microbianos como se describió en la sección 2.4.2. Las placas se incubaron durante 48 horas a 30°C prolongando ese tiempo hasta una semana en el caso de no observar crecimiento.

CAPITULO 3

EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y PERMEABILIDAD DE LA PELICULA DE ENVASE SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO EN CARNES REFRIGERADAS

3.1 Composición Inicial de la Flora Microbiana

El rango de los valores experimentales de la composición inicial de la flora microbiana se puede observar en la Tabla 3. Esos valores fueron obtenidos a través de la aplicación simultánea, a los organismos que desarrollaban sobre PCA y sobre cada medio selectivo, de los esquemas de identificación descriptos.

Tabla 3. Distribución porcentual de la flora microbiana inicial

Géneros	%
<u>Pseudomonas</u>	30-40
<u>Lactobacillus</u>	25-35
<u>B. thermosphacta</u>	20-28
Levaduras	4-8
<u>Enterobacteriaceae</u>	3-7

Los géneros aislados presentaban las características siguientes:

Pseudomonas

Gram (-)

Aeróbicas

Forma: bacilar

No esporuladas

Oxidasa (+)

Catalasa (+)

Utilización de la glucosa en forma oxidativa

Arginina hidrolasa (+)

Movilidad (+)

Desarrollaban bien sobre agar Masurovsky

Dentro de las especies pertenecientes a este género, las fluorescentes se encontraban en muy baja proporción y prácticamente no se detectaban durante el almacenamiento.

B. thermosphacta (antes denominado Microbacterium thermosphactum)

Gram (+)

Anaerobias facultativas

Forma: presentan formas irregulares (células alargadas y filamentosas) muy características, lo que las hace fácilmente diferenciables por observación microscópica, como se puede apreciar en la Fig. 2.

Catalasa (+)

Utilizan la glucosa en forma oxidativa y fermentativa

Movilidad (-)

Desarrollan bien sobre el medio S.T.A.A.

Lactobacillus

Gram (+)

Microaerófilos

Forma : bacilos pequeños

No esporulados

catalasa (-)

Utilizan la glucosa en forma oxidativa y fermentativa



Fig. 2: Micrografía de Brochothrix thermosphacta

Movilidad (-)

Desarrollan bien en el agar M.R.S. y fueron los organismos predominantes en las placas de PCA incubadas en anaerobiosis.

Levaduras

Forma: esferoidal

Reproducción por gemación

Se distinguían fácilmente de las bacterias, por observación microscópica, debido a su mayor tamaño y forma de reproducción.

Desarrollaban bien en agar Wort y se observó además el crecimiento de algunas colonias sobre agar M.R.S. junto con lactobacilos. Las colonias de levaduras eran mucho más grandes y cremosas que las de esas bacterias.

No se detectó la presencia de hongos.

Staphylococcus

Gram (+)

Forma: cocos

Anaerobios facultativos

No esporulados

catalasa (+)

Fermentan la glucosa en anaerobiosis

Inicialmente se encontró un bajo número de estafilococos (menor del 1% del total de la flora), pero durante el almacenamiento no se detectó la presencia de los mismos. Esto indujo a pensar que este género no desarrolla bajo las condiciones empleadas en el presente trabajo, atribuyéndolo a la imposibilidad de estos microorganismos de competir con la flora natural de la carne, como se menciona en la literatura,

Se buscó principalmente detectar la presencia de S. aureus a través

de la prueba de la DNasa. Si bien se encontraron algunas colonias sospechosas (DNasa (+)), que presumiblemente serían S. aureus , su número era tan bajo que no representaban ningún peligro en la carne; además como se indicó anteriormente estas bacterias no crecen en las condiciones utilizadas.

Enterobacteriaceae

Gram (-)

Forma: bacilos

No esporulados

Oxidasa (-)

Anaerobias facultativas

Fermentan la glucosa en anaerobiosis

La clasificación de los miembros de esta familia se realizó de acuerdo al Manual Var-ident 20 (Inolex)

No se observó la presencia de salmonelas en ninguna de las muestras analizadas. Las bacterias identificadas fueron las siguientes:

- Escherichia coli

Las reacciones positivas fueron las que se mencionan a continuación:

Glucosa - -galactosidasa-Indol-Lisina y ornitina descarboxilasa

sorbitol - arabinosa - maltosa - trehalosa - xilosa -

Esto permitió identificar a estas enterobacterias como E. coli.

- Citrobacter freundii

Reacciones positivas:

Glucosa - -Galactosidasa - H₂S - ornitina descarboxilasa

sorbitol - arabinosa - maltosa - trehalosa - xilosa

- Klebsiella ozaenae

Reacciones positivas:

Glucosa- β -galactosidasa-salicina-adonitol

sorbitol-arabinosa-maltosa-trehalosa-xilosa

- Proteus vulgaris

Reacciones positivas: Glucosa-fenilalanina desaminasa-indol- H_2S -ureasa

sacarosa-salicina-maltosa-trehalosa-xilosa

- Hafnia alvei

Reacciones positivas: Malonato-glucosa-lisina y ornitina descarboxilasa-ureasa

arabinosa-maltosa-trehalosa-xilosa

3.2 Influencia de la Termocontracción de la Película de Baja Permeabilidad sobre los Recuentos Iniciales

Los datos obtenidos a través de los recuentos iniciales de los microorganismos totales que desarrollan sobre las muestras de carne envasadas al vacío termocontraídas y no termocontraídas se analizaron estadísticamente a través de un ANAVA. (Apéndice 1, Tabla II).

El golpe térmico provocado por este proceso no tiene efecto sobre los recuentos iniciales pues el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% ($P > 0.05$).

La termocontracción de la película de EVA-SARAN-EVA se recomienda porque disminuye el exudado (Záratey Zaritzky, 1985) y mejora el aspecto del envase.

3.3 Desarrollo Microbiano sobre Carnes Envasadas en Películas Permeables al Oxígeno

3.3.1 Resultados

Valores promedios de los recuentos de microorganismos de las secciones de carne envasadas en polietileno y almacenadas a 4°C y 0°C se presentan en el Apéndice 2, Tablas I y II respectivamente. En dichas tablas se han utilizado para el cálculo de los promedios valores experimentales obtenidos en un trabajo previo (Zamora, 1982) los cuales fueron complementados con recuentos de

enterobacterias y levaduras incluyéndose asimismo los resultados correspondientes a las muestras control de las experiencias con sorbato de potasio (Capítulo 5).

En polietileno a 4°C (Fig. 3) las muestras después del séptimo día de almacenamiento presentaban recuentos superiores a 10^7 y signos de descomposición, tales como olores desagradables y zonas de color marrón causadas por la formación de metamioglobina; los valores de pH mostraron un ligero aumento de 0.15 unidades, aproximadamente.

Inicialmente especies de Pseudomonas, Lactobacillus y Brochothrix thermosphacta representaban aproximadamente el 90% de las bacterias presentes, pero al final del almacenamiento Pseudomonas era el género predominante. Las pseudomonas fluorescentes constituían solamente una pequeña fracción (3%) del total de este género.

En polietileno a 0°C (Fig. 4), la influencia de la temperatura fue muy notoria reflejándose en una extensión de la fase de latencia y en una disminución de la velocidad de crecimiento. El tiempo de almacenamiento se duplicaba al bajar la temperatura de 4°C a 0°C en el caso de carne con un pH inferior a 5.90. El porcentaje final de Pseudomonas sp., a 0°C, fue ligeramente superior al hallado a 4°C, ocurriendo lo mismo y en forma más pronunciada en el caso de las enterobacterias.

3.3.2 Discusión

Gilly y Newton (1977, 1978) afirmaban que en carne mantenida bajo condiciones aeróbicas, las especies de Pseudomonas tenían una marcada ventaja en la velocidad de crecimiento comparadas con otros géneros y esa ventaja tendía a incrementarse con el descenso de la temperatura; estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el presente trabajo.

Las pseudomonas no resultan afectadas por una superioridad numérica inicial de otros géneros y no hay interacciones significativas hasta que alcanzan el máximo nivel (alrededor de $10^9/\text{cm}^2$) restringiendo el crecimiento

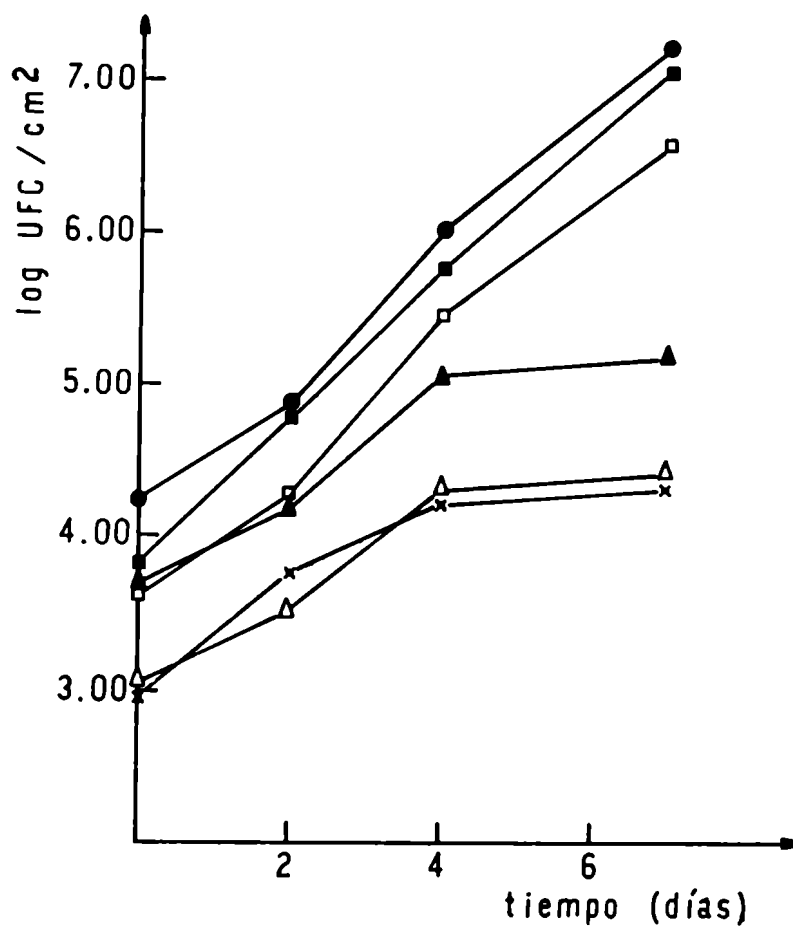


Fig. 3: Crecimiento microbiano durante el almacenamiento de carne bovina envasada en polietileno a 4°C .

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| ●- Recuentos aeróbicos | ■- <i>Pseudomonas</i> sp. |
| □- <i>B. thermosphacta</i> | ▲- <i>Lactobacillus</i> sp. |
| ×- <i>Enterobacteriaceae</i> | △- Levaduras |

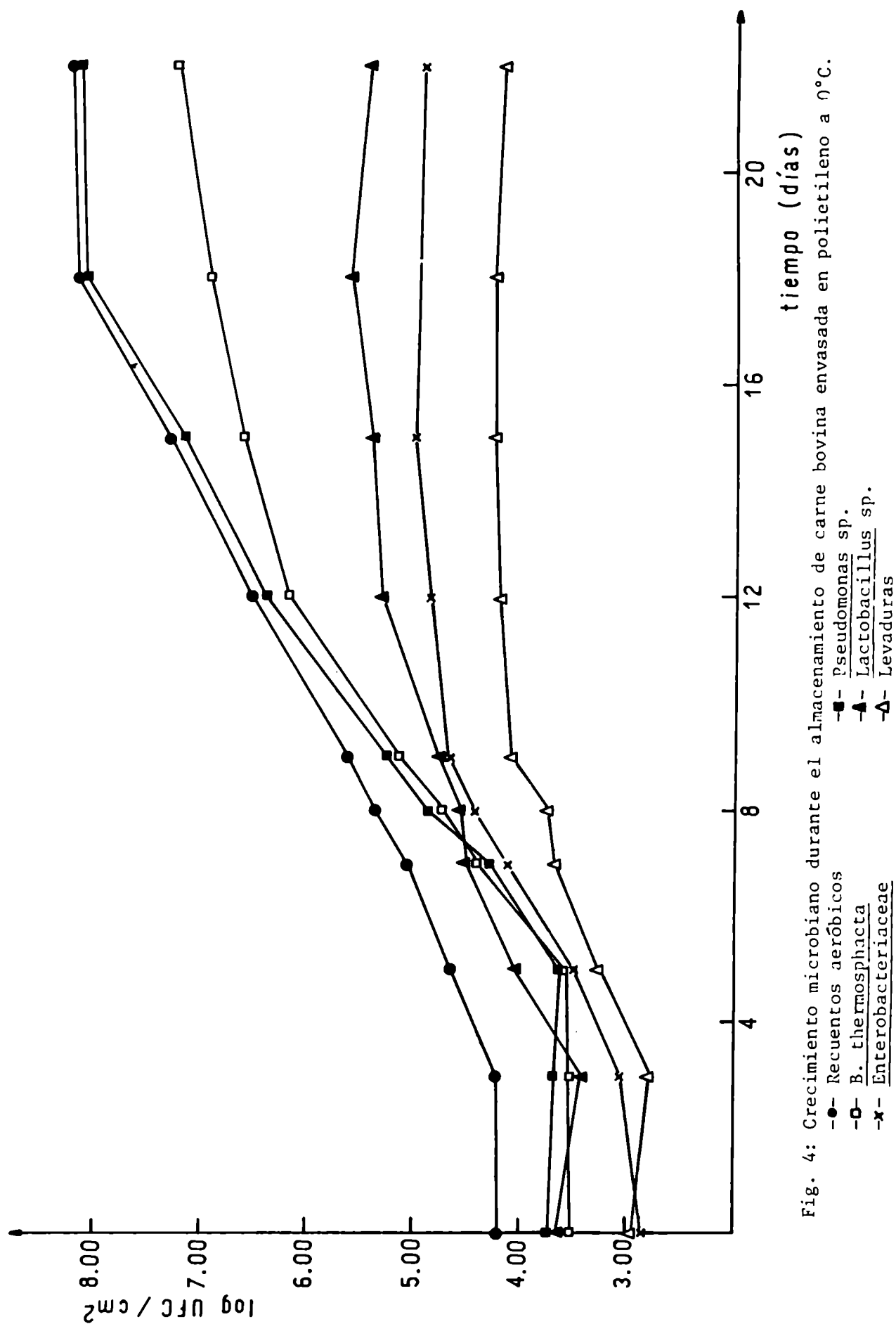


Fig. 4: Crecimiento microbiano durante el almacenamiento de carne bovina envasada en polietileno a 0°C.

- Recuentos aeróbicos
- B. thermosphacta
- x- Enterobacteriaceae
- ▲- Pseudomonas sp.
- △- Lactobacillus sp.
- ▽- Levaduras

de sus competidoras. Las bacterias anaerobias facultativas pueden desarrollar en presencia de alto número de pseudomonas, probablemente debido a que éstas secuestran el oxígeno disponible (Gill y Newton, 1977). Esto indica que, el desarrollo celular en aerobiosis esta determinado por el oxígeno y no por la limitación de glucosa en la superficie de la carne cuando el crecimiento cesa (Gill, 1976).

La presencia de bacteria anaerobias facultativas no afecta la velocidad de crecimiento de las aerobias, presumiblemente porque no reducen suficientemente el nivel de oxígeno como para limitar el desarrollo de pseudomonas. Sin embargo, por utilizar cierta cantidad de oxígeno, limitan el número de pseudomonas a la mitad de los valores alcanzados en cultivos puros (Gill y Newton, 1977).

Cuando los microorganismos exceden el valor de 10^8 UFC/cm² la concentración de glucosa en la superficie de la carne se reduce a cero; la concentración de amonio comienza a aumentar indicando que se ha iniciado el ataque a los aminoácidos. (Gill, 1976).

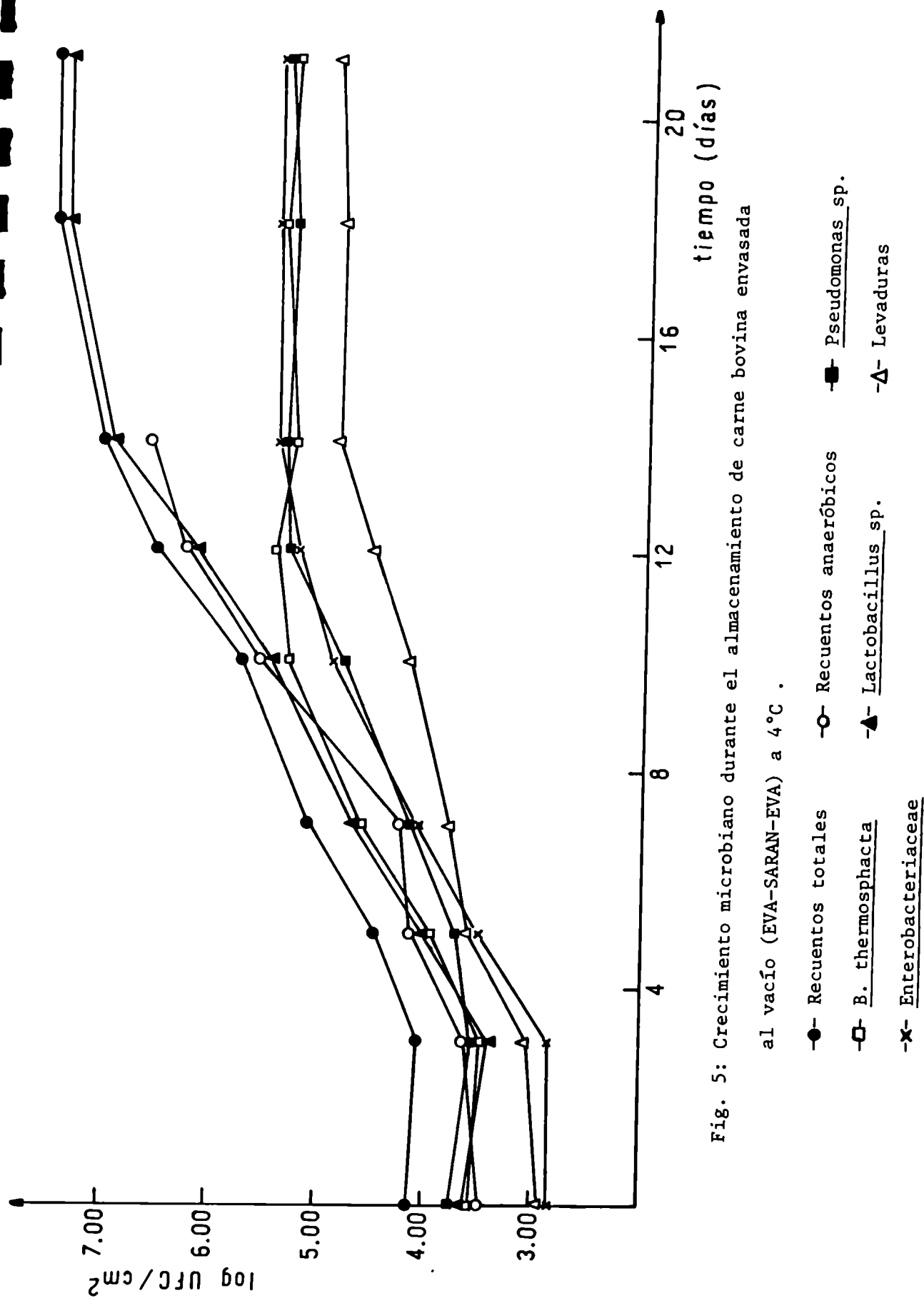
Los olores característicos asociados al deterioro se detectan cuando los recuentos alcanzan niveles de 10^7 UFC/cm² y la producción de limo superficial cuando llegan a 10^8 UFC/cm², los organismos deteriorantes son pseudomonas no pigmentadas (Ayres, 1960).

3.4 Desarrollo Microbiano sobre Carnes Envasadas en Películas de Baja

Permeabilidad al Oxígeno

3.4.1 Resultados

Valores promedios de los recuentos de microorganismos de las secciones de carne envasadas al vacío y almacenadas a 4°C y 0°C se presentan en el Apéndice 2, Tablas III y IV, respectivamente. En dichas tablas se han utilizado para el cálculo de los promedios valores experimentales obtenidos en un trabajo previo (Zamora, 1982) los cuales fueron complementados con recuentos de enterobacterias y levaduras incluyéndose asimismo los resultados corres-



pondientes a las muestras control de las experiencias con sorbato de potasio (Capítulo 5).

En los envases al vacío mantenidos a 4°C y con un pH < 5.9 (Fig. 5) se observó un aumento de la fase de latencia y una disminución de la velocidad de crecimiento, comparados con los valores obtenidos a la misma temperatura pero con películas permeables al oxígeno. El tiempo necesario para alcanzar recuentos de 10^7 UFC/cm² se extendió hasta aproximadamente 14 días; al final del mismo la carne no mostraba ningún tipo de alteración. Al concluir el período de almacenamiento Lactobacillus sp. representaban alrededor del 90% de la microflora, y sus recuentos fueron similares a los recuentos anaeróbicos.

Los mayores períodos de almacenamiento se lograron con los envases al vacío a 0°C. En la Fig. 6 se presentan los resultados de las muestras de pH < 5.9. En este caso se combinaron los efectos de la baja temperatura y la baja permeabilidad de la película. Fueron necesarios aproximadamente 38 días para alcanzar una población bacteriana de 7.00 (log UFC/cm²), comenzando con recuentos iniciales de 4.30 (log UFC/cm²). (Zamora, 1982)

Los valores de pH descendieron ligeramente (0.10 - 0.15 unidades) durante el almacenamiento. Pseudomonas sp. y B. thermosphacta crecieron al principio y luego su desarrollo se detuvo, mientras la población de lactobacilos continuaba su crecimiento. Los recuentos de enterobacterias obtenidos en vacío fueron superiores a los observados en polietileno.

Las experiencias realizadas con músculos de pH = 6.10 mostraron un comportamiento diferente. En este caso, B. thermosphacta creció rápidamente y fue la bacteria predominante durante el período de almacenamiento. Comparando los recuentos obtenidos luego de 28 días en muestras de pH = 5.6 y pH = 6.10 (Tabla 4), todos los microorganismos alcanzaban niveles más altos cuando de pH aumentaba; B. thermosphacta mostró una mayor velocidad de crecimen

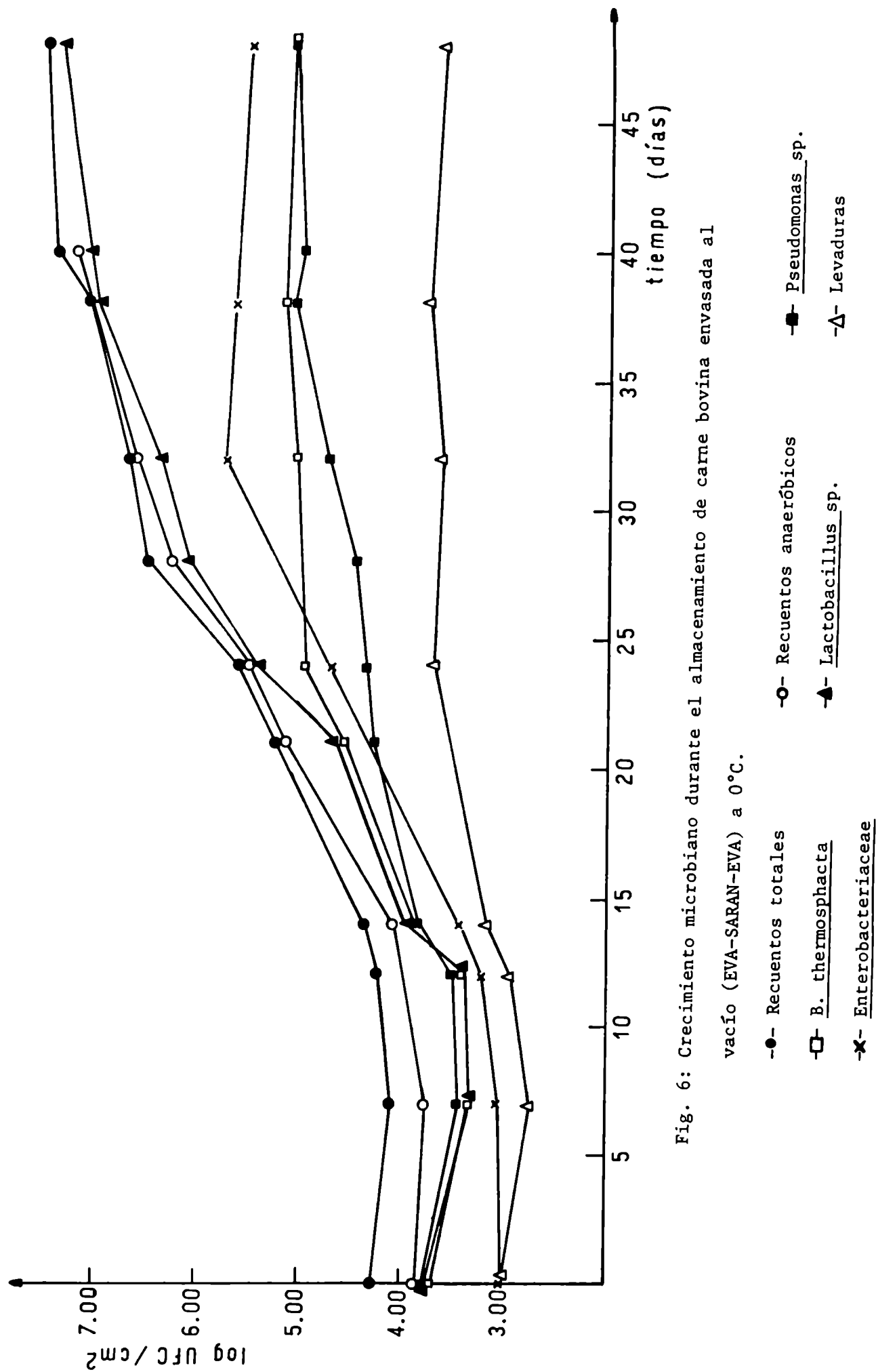


Fig. 6: Crecimiento microbiano durante el almacenamiento de carne bovina envasada al vacío (EVA-SARAN-EVA) a 0°C.

to, mientras Lactobacillus sp. fueron los menos afectados. Por lo tanto, el crecimiento de B. thermosphacta estuvo condicionado por el pH de la carne y la permeabilidad gaseosa de la película

Tabla 4. Efecto del pH de la carne sobre el crecimiento microbiano durante el almacenamiento en envases al vacío a 0°C

pH	Período de almacenamiento (días)	Recuentos aeróbicos	<u>B. thermo-</u> <u>sphacta</u>	<u>Lactoba</u> <u>cillus sp.</u>	<u>Pseudo-</u> <u>monas sp.</u>	Recuentos Anaeróbicos
6.10	0	4.35	3.80	3.80	3.90	4.15
6.05	28	7.20	6.90	6.80	5.50	7.15
5.60	0	4.15	3.50	3.55	3.70	3.90
5.60	28	6.00	4.90	5.90	4.50	5.95

3.4.2 Discusión

Con respecto a los tiempos de almacenamiento al vacío, se encontraron resultados similares a los informados por Johnson (1974), Seideman y Col. (1976).

Johnson (1974) observó que los recuentos bacterianos de carne bovina, procesada correctamente, envasada al vacío y almacenada a 0°C alcanzan valores de 10^7 (UFC/cm²) durante la quinta semana de almacenamiento. Seideman y Col. (1976) encontraron que los recuentos de psicrófilos, mesófilos y lactobacilos de carne envasada al vacío fueron de $10^{6.6}$ - $10^{7.1}$ por (pulgada)² luego de 35 días a 1-3°C.

Los resultados obtenidos por Roth y Clark (1975), en cuanto al desarrollo de B. thermosphacta, están de acuerdo con los hallados en el presente trabajo.

Las experiencias realizadas, por los investigadores mencionados, con

carne bovina inoculada con B. thermosphacta y Lactobacillus sp. en aire y en vacío a 5°C, demostraron que los lactobacilos restringen marcadamente el crecimiento de B. thermosphacta en vacío pero no en aire.

Newton y Gill (1978b) demostraron que alto número de Lactobacillus sp. o Enterobacter sp. inhibían el desarrollo de B. thermosphacta durante el almacenamiento anaeróbico de carne bovina.

Sin embargo, otros estudios mostraron que el crecimiento de B. thermosphacta podría ser restringido aún cuando otros microorganismos no estuvieran presentes; la población se incrementó desde 10^3 hasta solamente 10^5 UFC/cm² en carne almacenada bajo nitrógeno (Shaw y Nicol, 1969).

Gill (1976), Newton y Gill (1978 b) establecieron que la máxima densidad celular fue determinada por la concentración de sustratos fermentables.

Campbell y Col. (1979) analizaron el efecto del pH y la atmósfera gaseosa sobre el crecimiento de B. thermosphacta inoculando músculos estériles almacenados a 5°C. Cuando el pH del músculo era de 5.4 a 5.7, los microorganismos crecían rápidamente en condiciones aeróbicas, aunque en anaerobiosis el crecimiento no ocurrió. Con músculos de pH = 6.0 - 6.4 el desarrollo fue más rápido que el correspondiente a menor pH; bajo condiciones aeróbicas una importante velocidad de crecimiento fue observada. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el presente trabajo, evidenciando el hecho que en carne bovina envasada al vacío con pH menor que 6.0 el crecimiento de B. thermosphacta depende de la permeabilidad al oxígeno de la película, pero cuando el pH es mayor que 6.0, el crecimiento ocurre en todas las películas, aún en aquellos de muy baja permeabilidad.

En contraste con lo que ocurre bajo condiciones aeróbicas, en los envases al vacío hay competencia por la disponibilidad de sustratos, la glucosa es la principal fuente de carbono utilizada por Lactobacillus sp., B. thermo-

sphacta y Enterobacter sp., pero éste último también consume glucosa-6-fosfato y Lactobacillus sp., arginina. Experiencias realizadas con medios de cultivos artificiales, demostraron que Enterobacter sp. tienen mayor afinidad por la glucosa que B. thermosphacta, y éste último mayor que Lactobacillus sp.. Por lo tanto, el predominio del género Lactobacillus sobre carnes envasadas al vacío no se puede explicar a través de la afinidad por el sustrato; aparentemente, los lactobacilos inhiben el desarrollo de otras bacterias por la producción de un agente antimicrobiano. Esa sustancia ha sido relacionada con el ácido láctico (Grau, 1980) o el peróxido de hidrógeno formado por las especies de Lactobacillus, pero ninguna de las dos podría ser la verdadera causa dado que la cantidad de ácido láctico producida por esos microorganismos es insignificante comparada con la que ya contiene la carne; el peróxido de hidrógeno no se forma en ausencia de oxígeno. El inhibidor efectivo sería un antibiótico (Gill y Newton, 1978; Smith y Palumbo, 1981), el cual tendría mayor actividad a bajos pH (Collins-Thompson y Rodríguez López, 1982).

El deterioro de la carne almacenada anaeróbicamente se desarrolla lentamente, después que los microorganismos han alcanzado la máxima densidad celular; por lo tanto, los recuentos no tienen el mismo significado como medida del deterioro que la atribuida bajo condiciones aeróbicas, prolongándose los períodos de almacenamiento luego de que las bacterias exceden los valores de 10^7 UFC/cm² sin que la carne muestre signos de alteración. Egan y Col. (1980) estudiaron el deterioro de la carne envasada al vacío provocado por microorganismos como B. thermosphacta y lactobacilos, encontrando que la velocidad de deterioro decrecía en el siguiente orden:

B. thermosphacta - lactobacilos heterofermentativos - lactobacilos homofermentativos.

3.5 Interpretación del Crecimiento Microbiano a través de un Modelo Matemático

Un corte de carne o un envase de carne procesada es un sistema ecológico cerrado. Tomando en cuenta el rango de interacciones microbianas descripto es teóricamente posible predecir el resultado de la contaminación de una carne por microorganismos particulares. Los modelos matemáticos pueden jugar un creciente rol para ayudar al tecnólogo a predecir el curso del crecimiento y el deterioro de un producto.

El desarrollo microbiano de una flora mixta durante la fase de crecimiento exponencial puede ser representado por la siguiente ecuación:

$$\frac{N}{N_0} = \sum_{i=1}^n x_{i0} e^{\mu_i(t - \theta_i)} \quad \text{para } t \leq t_{ei} \quad (1)$$

donde:

N = número total de UFC/cm² al tiempo t

N_0 = número inicial de UFC/cm²

$i = 1, \dots, n$, componentes de la población microbiana

x_{i0} = fracción inicial de i en la flora total ($x_{i0} = N_{i0}/N_0$)

μ_i = velocidad de crecimiento de i , durante la fase exponencial (1/día)

θ_i = tiempo de latencia del componente i (días)

t_{ei} = tiempo para alcanzar la fase estacionaria correspondiente al componente i .

La ecuación (1) permite estimar el número de microorganismos que crecen sobre carne bovina en función del tiempo de almacenamiento.

3.5.1 Determinación de los Parámetros : velocidad de crecimiento y período de latencia

La composición inicial promedio de la flora mixta (\bar{x}_{i0}) y los errores standards de los recuentos ($\sigma_{\log N}$) se pueden observar en la Tabla 5.

Los valores de μ_i y θ_i de cada componente se obtuvieron a través de las experiencias realizadas; estos parámetros resultaron ser una función de la temperatura, pH de la carne y permeabilidad de la película de envase.

Tabla 5 : Composición inicial promedio de la flora microbiana

Microorganismos	\bar{x}_{io}	Error Standard σ (log N)	Límites de Confianza $\log N_{oi}$
<u>Pseudomonas</u> sp.	0.350	0.075	0.061
<u>Lactobacillus</u> sp.	0.300	0.064	0.052
<u>B. thermosphacta</u>	0.240	0.061	0.050
Levaduras	0.060	0.050	0.045
<u>Enterobacteriaceae</u>	0.050	0.035	0.034

Los parámetros de μ_i y θ_i de la ecuación (1) y las correspondientes desviaciones standard σ_{μ_i} y σ_{θ_i} se determinaron de la regresión lineal de los valores experimentales expresados como $\ln N_i = \ln N_0 + \mu_i(t - \theta_i)$.

El desvío standard de la pendiente fue calculado a partir de (Apéndice 3,a)

$$\sigma_{(\mu)} = \frac{S_r}{\sqrt{\sum (t - \bar{t})^2}} \quad (2)$$

siendo

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum (\ln N_i - \ln \bar{N}_i)^2 - \mu^2 \sum (t - \bar{t})^2}{n - 2}} \quad (3)$$

y n = número de datos experimentales

La estimación de σ_{θ_i} se obtuvo siguiendo el análisis de Regresión Inversa de Draper y Smith (1981); los "límites fiduciales" de θ_i fueron determinados por la intersección del intervalo de confianza del 95% alrededor de la lí

nea de regresión, con la línea recta horizontal de la fase de latencia (Fig. 7).

El intervalo de confianza de la regresión indicado con la línea de puntos resulta del producto del desvío standard de los valores medios estimados $\sigma_{\log Ni}$ y el parámetro "t" de Student seleccionado con los grados de libertad (n - 2) y el nivel de probabilidad deseado (95%).

El desvío standard de cada valor medio estimado de log Ni para los distintos valores de tiempo de almacenamiento (t) se calculó a través de la siguiente expresión:

$$\sigma_{(\log Ni)} = \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(t - \bar{t})^2}{\sum (t - \bar{t})^2} \cdot S_r} \quad (4)$$

Los resultados obtenidos para cada microorganismo bajo diferentes condiciones de almacenamiento, sobre músculos de pH < 5.9 y recuentos iniciales totales entre $10^{3.9}$ y $10^{4.4}$ (UFC/cm²) se muestran en la Tablas 6 y 7 para el envasado en polietileno y al vacío, respectivamente. En las mismas Tablas se incluyen los valores promedios del tiempo necesario para llegar a la fase de crecimiento estacionario.

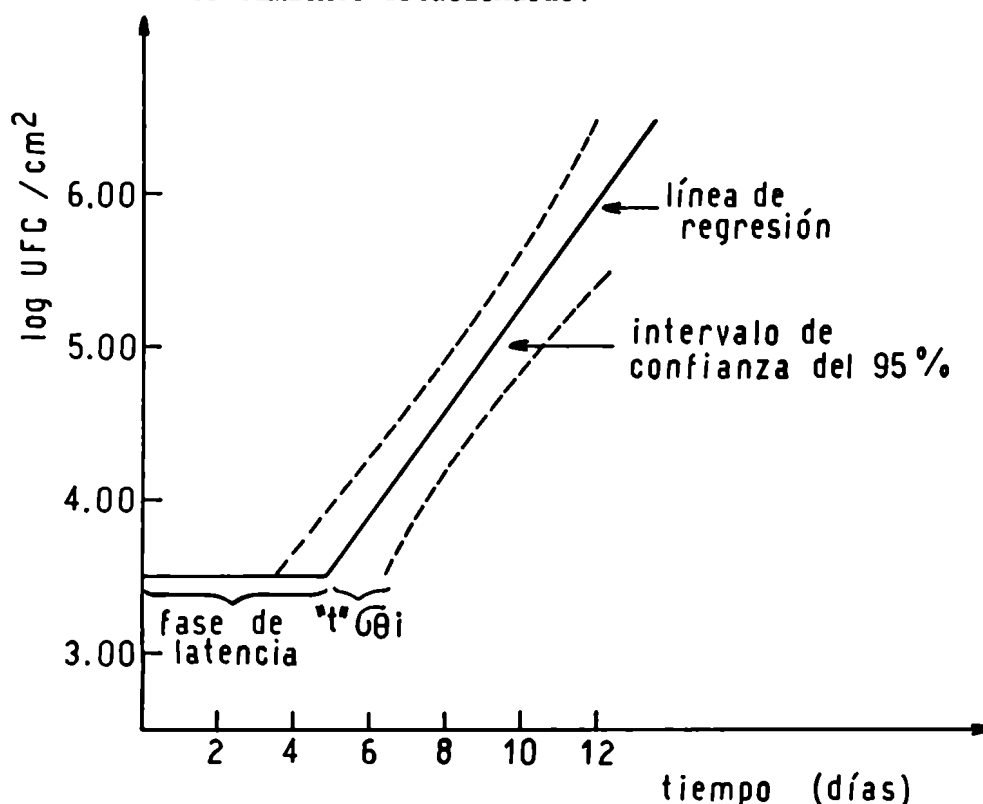


Fig. 7. Estimación del desvío standard $\sigma_{\theta i}$.

Tabla 6: Velocidad de crecimiento y tiempo de latencia de los microorganismos que desarrollan en carnes envasadas bajo condiciones aeróbicas (Polietileno)

Microorganismos	0°C					4°C				
	Velocidad de crecimiento μ (1/día)	σ_{μ}	Tiempo de latencia θ_i (días)	$\sigma_{\theta i}$	Fase estacionaria (días)	Velocidad de crecimiento μ (1/día)	σ_{μ}	Tiempo de latencia θ_i (días)	$\sigma_{\theta i}$	Fase estacionaria (días)
<u>Pseudomonas sp.</u>	0.795	0.055	5.0	0.6	18	1.070	0.025	0	0.2	> 7
<u>B. thermosphacta</u>	0.724	0.058	5.0	0.7	16	1.000	0.063	0	0.5	> 7
<u>Lactobacillus sp.</u>	0.450	0.018	3.0	0.4	12	0.805	0.078	0	0.2	4
<u>Enterobacteriaceae</u>	0.650	0.018	2.5	0.4	10	0.900	0.020	0	0.2	3
Levaduras	0.450	0.028	3.0	0.6	10	0.750	0.105	0	0.4	4

Tabla 7: Velocidad de crecimiento y tiempo de latencia de los microorganismos que desarrollan en carnes envasadas al vacío (EVA-SARAN-EVA).

Microorganismos	0°C			4°C		
	Velocidad de crecimiento μ (1/día)	σ_{μ}	Tiempo de latencia θ_i (días)	$\sigma_{\theta i}$	Fase estacionaria (días)	Fase estacionaria (días)
<u>Pseudomonas</u> sp.	0.131	0.008	14.0	1.1	35	12
<u>B. thermosphacta</u>	0.264	0.017	12.0	0.6	24	10
<u>Lactobacillus</u> sp.	0.310	0.008	12.0	0.8	40	16
<u>Enterobacteriaceae</u>	0.258	0.010	9.0	0.9	33	12
Levaduras	0.133	0.009	12.0	0.5	22	14

3.5.2 Propagación de Errores

La estimación de la varianza del log N se realizó a través de la propagación de errores de la Ecuación (1) (Himmelblau, 1970).

La función:

$$y = \log N = f(N_{i0}, \mu_i, \theta_i)$$

fue primero linealizada expandiendo en serie de Taylor alrededor de un estado de referencia indicado por el supraíndice (*). Luego de aplicar la propagación de errores se obtuvo el siguiente resultado:

$$\sigma_y^2 = \frac{\alpha}{(N^*)^2} \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{\partial f^*}{\partial N_{i0}} \right)^2 \sigma_{N_{i0}}^2 + \left(\frac{\partial f^*}{\partial \mu_i} \right)^2 \sigma_{\mu_i}^2 + \left(\frac{\partial f^*}{\partial \theta_i} \right)^2 \sigma_{\theta_i}^2 \right] \quad (5)$$

donde $\alpha = (\log e)^2 = (0.4343)^2$

El estado de referencia seleccionado fue el correspondiente a la mitad del período de almacenamiento de la carne envasada bajo las distintas condiciones de temperatura y permeabilidad de la película ($t_{0.5}$). La expresión final del cálculo de la propagación del error standard fue:

$$\sigma_{\log N} = \frac{0.4343}{N^*} \left[\sum_{i=1}^n N_i^{*2} \left(\frac{\sigma_{N_{i0}}^2}{N_{i0}^2} + (t^* - \theta)^2 \sigma_{\mu_i}^2 + \mu_i^2 \sigma_{\theta_i}^2 \right) \right]^{1/2} \quad (6)$$

Tomando en consideración que la población microbiana se distribuye en forma normal logarítmica, $\sigma_{N_{i0}}^2$ fue calculada de la manera siguiente:

$$\sigma_{N_{i0}}^2 = \frac{\sigma_{\log N_{i0}}^2 \cdot N_{i0}^2}{(\log e)^2}$$

en esta ecuación el valor de $\sigma_{\log N_{i0}}$ fue obtenido de la Tabla 5.

La ecuación (1) permite predecir los recuentos microbianos ($\log N$) usando la información de las Tablas 5, 6 y 7. La aplicación de esa ecuación

a un tiempo correspondiente, aproximadamente, a la mitad de la vida útil para cada condición de almacenamiento se muestra en la Tabla 8 (valores predichos); éstos fueron comparados con los datos experimentales de los recuentos aeróbicos, expresados como $\log N_{\text{exp}}$. Ambos resultaron ser muy similares obteniéndose un bajo porcentaje de diferencia entre los mismos.

El error standard del modelo ($\sigma_{\log N}$) fue calculado a partir de la ecuación (6).

Tabla 8: Comparación de la población microbiana predicha y los recuentos experimentales

Película de envase	Temperatura (°C)	Días de almacenamiento	Valores predichos de $\log N$ Ec. (1)	$\sigma_{\log N}$ Ec. (6)	Recuentos microbianos $\log N_{\text{exp}}$	% diferencia en $\log N$
Polietileno	0	8	5.34	0.09	5.40	1.11
Polietileno	4	3.5	5.78	0.09	5.80	0.34
EVA-SARAN-EVA	0	20	5.17	0.06	5.20	0.58
EVA-SARAN-EVA	4	8	5.41	0.07	5.43	0.37

3.6 Aplicaciones del Modelo

3.6.1 Determinación de la composición de la flora microbiana durante el almacenamiento

El modelo, por medio de la ecuación (1), permite determinar la composición de la flora microbiana de la carne envasada y mantenida bajo diferentes condiciones de almacenamiento. La Tabla 9 muestra los porcentajes de distribución de la flora calculados a los períodos correspondientes a aproximadamente el final de la vida útil. Los valores obtenidos de esta manera fueron confirmados experimentalmente encontrándose una muy buena correlación entre ambos resultados.

Tabla 9: Porcentajes de distribución de la flora microbina que desarrolla sobre carne bovina envasada y almacenada bajo diferentes condiciones (Valores finales)

Microorganismos	EVA-SARAN-EVA 0°C 35 días		EVA-SARAN-EVA 4°C 14 días		POLIETILENO 0°C 14 días		POLIETILENO 4°C 7 días	
	pred.	exp.	pred.	exp.	pred.	exp.	pred.	exp.
<u>Pseudomonas sp.</u>	1.3	1.2	1.9	2.1	69.2	70.8	67.6	69.2
<u>Lactobacillus sp.</u>	91.1	87.1	92.3	95.5	3.5	2.2	1.8	1.0
<u>B. thermosphacta</u>	1.4	1.8	2.1	1.8	26.1	28.2	29.5	23.4
Levaduras	0.2	0.1	0.6	0.7	0.2	0.2	0.2	0.2
<u>Enterobacteriaceae</u>	5.9	6.9	3.1	2.2	1.0	0.8	0.1	0.1

3.6.2 Tiempo de Maduración

El conjunto de transformaciones que ocurren después del estado de rigor mortis conduce a un proceso gradual de tiernización denominado maduración. Debido a la complejidad del fenómeno aún no se ha podido dar una explicación a todos los cambios que ocurren durante el mismo. Algunas alteraciones observadas en la estructura de las miofibrillas y en las propiedades de las proteínas miofibrilares podrían ser responsables del incremento en la terniza.

El proceso comienza cuando el músculo entra en el estado de rigor y los iones Ca^{2+} son liberados del retículo sarcoplasmático. Al elevarse la concentración de Ca^{2+} se activan enzimas que lentamente atacan la troponina T y las proteínas de la región de la línea Z. Al cabo de 2 ó 3 días de almacenamiento la degradación de proteínas alcanza un nivel tal que hace visibles,

a través del microscopio electrónico, los cambios estructurales ocurridos cerca de la línea Z. Las propiedades de unión de las proteínas miofibrilares son alteradas, dando una mayor soltura a la estructura miofibrilar, desintegrándose más fácilmente por homogenización. La línea Z es una estructura más compleja que una simple unión α -actinina a filamentos de actina como se creía en un principio, estando involucradas otras proteínas.

Esos, comparativamente, pequeños cambios dan una considerable reducción en la dureza del músculo que pueden ser detectados por un panel o por medidas instrumentales de textura.

No hay duda de que las enzimas proteolíticas son responsables de los cambios que ocurren durante la maduración, pero solamente las activadas por calcio y las catepsinas B y D degradan las proteínas miofibrilares (Penny, 1980).

Diferentes períodos de maduración para carne bovina son recomendados en la literatura, basados en muchos casos solamente en la terneza, sin considerar el crecimiento microbiano que es el factor principal que limita dichos períodos.

De Man y col. (1976) indicaron alrededor de 10-14 días a 5°C, que constituye un período muy largo dado que bajo condiciones aeróbicas ocurre intenso crecimiento bacteriano.

Effenberger y Schotte (1972) consideraron que 5 a 6 días a 0°C son suficientes.

Mac Dougall (1971) informó los resultados obtenidos por diversos autores quienes coincidieron que el proceso de tiernización ocurre durante los primeros 14 días entre 0.5 y - 2°C, no observando cambios apreciables en el transcurso de las semanas siguientes.

Larmond y col. (1969) compararon los cambios en la terneza a 1°C

durante 2, 9 y 16 días observando que las muestras almacenadas 9 días eran más tiernas que las correspondientes a 2 días; no se observaron diferencias significativas entre las muestras de 9 y 16 días.

Tomando en cuenta los estudios mencionados de terneza y estableciendo 10^5 UFC/cm² como límite de los recuentos microbianos en carnes destinadas para su directa comercialización o para congelación, el modelo permite estimar los períodos de maduración en carnes envasadas al vacío. Los tiempos recomendados son 14 días a 0°C y 6 días a 4°C. En ambos casos el pH fue inferior a 6.0 y la población microbiana inicial de 10^4 UFC/cm² o menor.

Si la maduración se efectúa usando películas de alta permeabilidad al oxígeno, los tiempos especificados excederían los límites de contaminación establecidos anteriormente.

3.6.3 Predicción de la Vida Util de la Carne

En la Tabla 10 se muestran los datos correspondientes al tiempo necesario para alcanzar una población total de 10^7 UFC/cm² correspondientes a las determinaciones microbianas sobre muestras con niveles de contaminación inicial de 10^4 .

Los valores experimentales fueron comparados con los obtenidos a través del modelo, observándose un satisfactorio ajuste del mismo.

Por lo tanto, se puede concluir que la ecuación propuesta y los parámetros medidos permiten una satisfactoria predicción del crecimiento microbiano en carne bovina refrigerada y envasada, en condiciones de almacenamiento que son muy comunes en la industria cárnica.

Tabla 10: Tiempo necesario para alcanzar una densidad celular de 10^7 UFC/cm² (t_{10^7}) (pH < 6.0) a partir de contaminación inicial de 10^4 UFC/cm²

Condiciones de almacenamiento	t_{10^7} (días)	
	experimental	predicho
EVA-SARAN-EVA 0°C	38	38
EVA-SARAN-EVA 4°C	14	15
Polietileno 0°C	14	15
Polietileno 4°C	7	7

3.7 Efecto de la Permeabilidad del Envase sobre la Coloración Superficial

Desde el punto de vista microbiológico la vida útil de la carne envasada en polietileno a 0°C y en EVA-SARAN-EVA a 4°C es la misma (Tabla 10); pero, considerando la apariencia del producto que fue evaluado a través de medidas colorimétricas, en términos de los parámetros triestímulos, un mejor color fue obtenido cuando se usó una película de baja permeabilidad.

Durante el almacenamiento al vacío el parámetro "a" se mantuvo constante, demostrando que el color inicial del músculo, debido a la presencia de mioglobina, se preservó bien. En contraste, el valor "a" disminuye notablemente cuando se usó polietileno, debido a la formación de metamioglobina (Tabla 11). (Zamora, 1982).

Tabla 11: Efecto de la permeabilidad del envase sobre la coloración superficial

	L	a	b
Inicial	39.74	13.43	9.95
14 días de almacenamiento en Polietileno a 0°C	42.10	9.36	9.74
14 días de almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C	42.80	13.63	11.00

La formación de oximioglobina durante la reoxigenación de carne bovina envasada al vacío se muestra en la Tabla 12, donde el incremento del parámetro "a" alcanza el máximo valor entre los 50 y 60 minutos luego de la apertura de las bolsas plásticas. En el caso de los envases de polietileno, la reoxigenación no ocurre porque hubo formación de metamioglobina.

Tabla 12: Reoxigenación de carne bovina envasada al vacío

Tiempo (min.)	L	a	b
0	42.80	13.64	11.00
10	41.29	14.67	12.17
20	42.71	13.94	11.88
30	43.03	15.60	10.80
50	38.16	20.35	12.51
60	40.14	19.36	12.06
80	39.00	17.23	12.72

CAPITULO 4

MODIFICACIONES EN LA COMPOSICION DE LA ATMOSFERA GASEOSA DEL INTERIOR DE LOS ENVASES AL VACIO

4.1 Medición Cromatográfica

La composición gaseosa del interior de los envases al vacío depende de la permeabilidad de la película, del volumen de aire residual en contacto con la carne (grado de vacío) y de la velocidad de consumo de oxígeno del músculo y de los microorganismos.

Los cambios ocurridos en la atmósfera gaseosa, de carnes envasadas al vacío, se evidenciaron a través de las variaciones de CO_2 , O_2 y N_2 .

En la Fig. 8 se muestran los cromatogramas correspondientes a la composición gaseosa inicial (a), luego de 6 hs de envasado (b) y al cabo de un almacenamiento de 5 días a 4°C (c). (Zamora, 1982).

Se observa una rápida evolución de CO_2 , dado que a las 6 hs se registra una concentración superior al 6% habiendo partido de un 0.18%; a los 5 días el CO_2 se incrementó hasta un 18%.

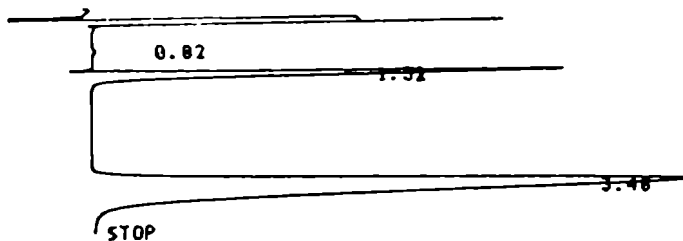
La concentración de O_2 disminuye pero en forma más lenta, ocurriendo lo mismo con el N_2 .

Los niveles de O_2 y CO_2 encontrados por otros autores son superiores a los del presente trabajo, esto se atribuye a la relación: volumen de espacio gaseoso/volumen de muestra, donde al reducir el espacio libre se obtienen mayores valores de CO_2 y menores de O_2 .

Seideman y col. (1979) midieron la composición de la atmósfera con una relación volumen gaseoso/volumen de muestra muy baja, obteniendo concentraciones de CO_2 muy superiores a las informadas en otros trabajos.

Fig. 8: Análisis Cromatográfico de la Atmósfera Gaseosa

START 00.00.00.00.



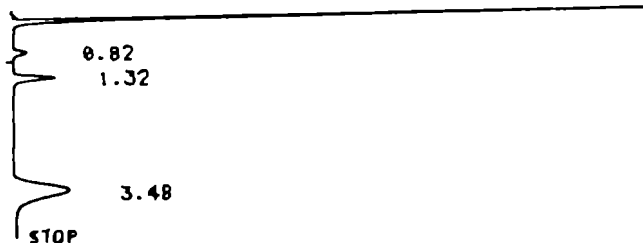
C-R1A
SMPL #
FILE #
REPT #
METHOD

00
1
22
41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		0.82	0.1762		40
0		1.32	21.7324		4945
0		3.48	78.0913		12771
	TOTAL		99.9999		22756

a) inicial

START 00.00.00.00.



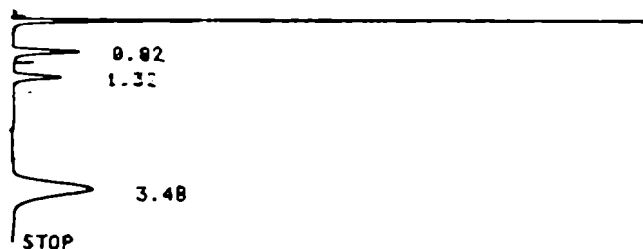
C-R1A
SMPL #
FILE #
REPT #
METHOD

00
1
21
41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		0.82	6.3399		141
0		1.32	18.7199		418
0		3.48	74.9401		1674
	TOTAL		99.9999		2235

b) t = 6 horas

START 00.00.00.00.



C-R1A
SMPL #
FILE #
REPT #
METHOD

00
1
14
41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		0.82	18.1154		630
0		1.32	14.6821		510
0		3.48	67.2024		2337
	TOTAL		99.9999		3477

c) t = 5 días

4.2 Estimación de los Parámetros que Interpretan las Modificaciones en la Composición Gaseosa del Interior de los Envases al Vacío

El interior de la carne, antes de ser cortada, está esencialmente libre de oxígeno, como lo indica el color púrpura de la mioglobina. Cuando se secciona, el músculo tiende a acercarse a una nueva condición de equilibrio respecto a la presión parcial de oxígeno del aire y a la temperatura.

La composición gaseosa inicial de los envases al vacío corresponde a la del aire, modificándose solamente la presión total. Sin embargo, dicha composición se ve rápidamente afectada por la disolución de los gases en los fluidos tisulares.

En la Fig. 9 se resumen las interacciones que ocurren entre el tejido y la atmósfera que lo rodea, y el intercambio gaseoso a través de la película.

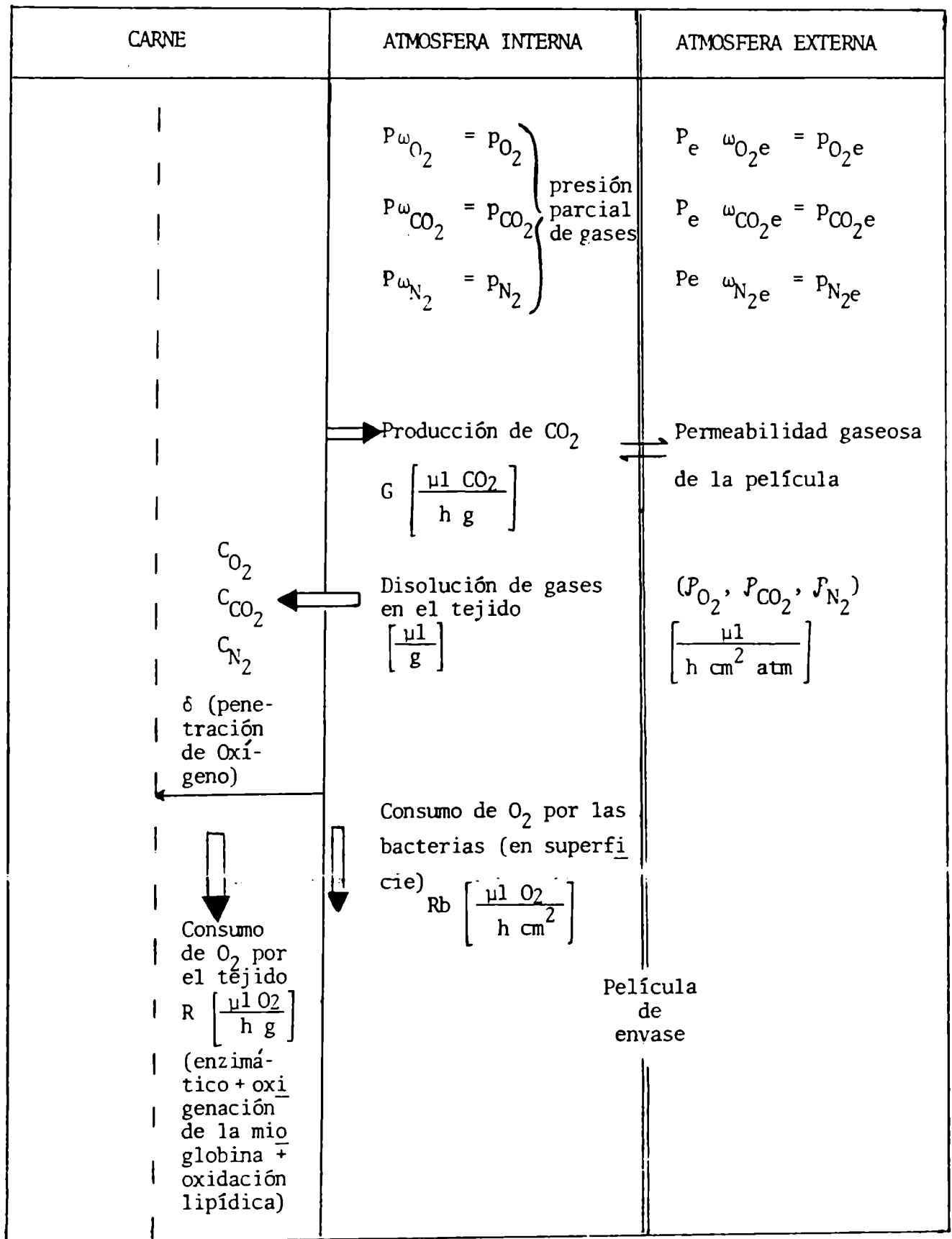
La composición de la atmósfera gaseosa que rodea al músculo cárnico (ω_{O_2} , ω_{CO_2} , ω_{N_2}) es el resultado de: 1) el consumo de oxígeno por el músculo (R), que se atribuye a las enzimas respiratorias, a la oxigenación de la mioglobina y a la oxidación lipídica; 2) la demanda bacteriana superficial de oxígeno (Rb); 3) la solubilidad de los gases en el tejido, que en forma general podría indicarse como $p = H \cdot c$, siendo p la presión parcial del gas y c la concentración de dicho gas en el tejido; 4) la producción de CO_2 (G); 5) la permeabilidad gaseosa de la película (P)

4.2.1 Consumo de Oxígeno por el Tejido (R)

4.2.1.1 Consumo Enzimático

El consumo de oxígeno debido a la respiración del tejido requeriría que el músculo contenga un sistema enzimático activo y un depósito residual de sustratos respiratorios.

Fig. 9: Factores que afectan la composición de la atmósfera que rodea al tejido cárneo envasado.



La actividad de enzimas respiratorias en el músculo post-mortem ha sido demostrado por varios investigadores (Andrews y col. 1952; Grant, 1955; Bodwell y col. 1965a) y cantidades sustanciales de sustratos respiratorios han sido observados durante el almacenamiento post-mortem (Bodwell y col. 1965b; Atkinson y col. 1969; Newbold y Scopes, 1971).

Otros estudios realizados por Cheah y Cheah (1971) indicaron que las mitocondrias del músculo bovino permanecen intactas y activas luego de 144 horas post-mortem, siempre que el pH sea superior a 5.5.

Las enzimas mitocondriales van perdiendo actividad durante el almacenamiento. La velocidad de consumo de oxígeno no correspondiente a la respiración permanece constante hasta las 30 horas, mientras que el consumo de oxígeno respiratorio declina exponencialmente. Esta declinación parece estar parcialmente relacionada a la reducción de la actividad enzimática y al agotamiento de sustratos (De Vore y Solberg, 1974).

Andrews y col. (1952), Grant (1955) encontraron que el sistema enzimático respiratorio de mayor estabilidad en la carne era el de la succínico deshidrogenasa, cuyo óptimo pH era aproximadamente de 7.8; al descender el pH la velocidad de consumo de oxígeno también se reducía.

Diversos investigadores han realizado mediciones del consumo de oxígeno por el tejido (Brooks, 1929; Urbin y Wilson, 1961; Bendall y Taylor, 1972; De Vore y Solberg, 1974); dichos consumos resultan ser funciones, princípalmente, del tipo de músculo y de la temperatura.

A partir de datos de literatura Bevilacqua y Zaritzky (1985), ajustando matemáticamente los valores de penetración de oxígeno en función del tiempo, encontraron que el consumo de oxígeno decrecía exponencialmente con el tiempo de acuerdo con la siguiente expresión :

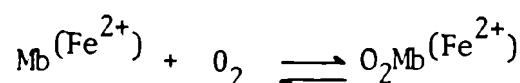
$$R = R_0 e^{-\gamma t} \quad (5)$$

donde $R_0 = 3.96 \mu\text{l O}_2/\text{h/g}$ de tejido (a 0°C) y $\gamma = 3.47 \times 10^{-3}/\text{h}$.

Bendall y Taylor (1972) hallaron una energía de activación igual a $E = 18.2 \pm 0.3 \text{ Kcal/mol}$ ($Q_{10} = 3.28$, entre 0°C y 10°C), lo que permitió determinar el consumo de oxígeno a distintas temperaturas.

4.2.1.2 Oxigenación de la Mioglobina

La mioglobina (Mb) del músculo puede unirse al oxígeno para formar oximioglobina (O₂Mb), o puede ser oxidada por el oxígeno para formar metamioglobina (MetMb)



Este complejo rojo brillante, se estabiliza por la formación de una estrutura altamente resonante. Sin embargo, el oxígeno está continuamente asociándose y disociándose del complejo. La disociación está acelerada por una serie de factores, entre ellos por la presión parcial de oxígeno; si ésta es mayor de 30 mm Hg la reacción reversible se desplaza hacia la derecha.

Cutaia y col. (1964) observaron que bajo condiciones anaeróbicas se produce una acumulación inicial de metamioglobina, debido probablemente a la autoxidación del pigmento ferroso a bajas tensiones de oxígeno. Finalmente, cuando el potencial de óxido-reducción es suficientemente bajo, se forma nuevamente mioglobina. Estos cambios ocurren durante las primeras horas de envasado mientras la capacidad reductora del tejido no haya disminuido.

La velocidad de formación de metamioglobina y su conversión a mioglobina en carne bovina envasada al vacío fue estudiada por Pierson y col.

(1970). En la Fig. 10 se muestran los cambios iniciales que sufren los pigmentos, partiendo de un músculo con un 100% de oximioglobina. El descenso de la presión parcial de oxígeno provoca una rápida disminución en la cantidad de oximioglobina presente y el comienzo de la formación de metamioglobina. La oximioglobina llega a cero en el máximo de metamioglobina.

Al cabo de 8 horas aproximadamente ya se han completado todas estas transformaciones, obteniéndose el 100 % de mioglobina nuevamente.

Es importante que antes del envasado al vacío, la carne esté poco tiempo en contacto con el oxígeno pues hay una pérdida de la capacidad reductora del tejido en función del tiempo de exposición.

En las experiencias realizadas para el presente trabajo, el músculo se envasó inmediatamente después de ser seccionado para evitar la formación de oximioglobina.

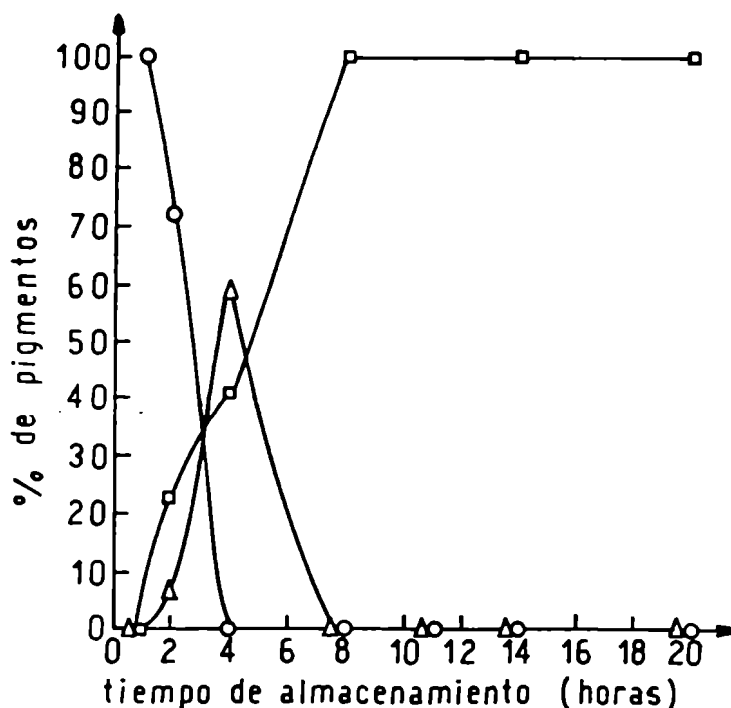


Fig. 10: Cambios iniciales de los pigmentos de carne bovina envasada al vacío a 3.3°C (Pierson y col., 1970).

-○- oximioglobina -□- mioglobina
-△- metamioglobina

En base a lo expuesto, se puede considerar que, el consumo de oxígeno en las reacciones con los pigmentos de la carne envasada al vacío es despreciable.

4.2.1.3 Oxidación Lipídica

De Vore y Solberg (1974) no detectaron consumo de oxígeno debido a oxidación de lípidos, atribuyéndolo a que en sus experiencias utilizaron músculos enteros.

Liu y Watts (1970) postularon que en un músculo intacto la oxidación de los lípidos podría ser minimizada, debido a que la interacción de ácidos grasos poliinsaturados con proteínas del hemo estaría limitada por la integridad estructural.

4.2.2 Demanda Bacteriana de Oxígeno (Rb)

El consumo de oxígeno por demanda bacteriana es despreciable al principio del almacenamiento donde los recuentos son bajos. De acuerdo con Greig y Hoogerheide (1941), una célula de Pseudomonas fluorescens requiere 9.7×10^{-8} μl de O_2/h a 30°C ; para obtener el dato a otras temperaturas se consideró un $Q_{10} \approx 4$, (Rosset, 1982) presentándose los valores en la Tabla 13.

Tabla 13 Variación del consumo bacteriano de oxígeno con la temperatura
(Pseudomonas fluorescens)

T ($^\circ\text{C}$)	Consumo de O_2 ($\mu\text{l}/\text{h}/\text{cel.}$) $\times 10^7$
30	0.970
20	0.243
10	0.060
5	0.030
0	0.015

En la Tabla 14 se muestra el consumo de oxígeno a 0°C para dos niveles de contaminación que representarían los estados inicial y final de un envase de carne.

Tabla 14. Efecto del número de microorganismos en el consumo de oxígeno

<u>Nº de células</u> g	Consumo de O ₂ (µl/h/g)
3.5 x 10 ³	5.3 x 10 ⁻⁶
1.0 x 10 ⁸	0.15

Si se comparan los valores de la Tabla 14 con el consumo enzimático inicial de oxígeno a 0°C (3.96 µl O₂/h/g), se puede concluir que la demanda bacteriana comienza a ser importante cuando la población microbiana es superior a 10⁸/g.

En carne envasadas al vacío, la demanda bacteriana es aún menor pues la flora está dominada por especies de Lactobacillus que son microaerófilos, y por lo tanto sus requerimientos de oxígeno son mínimos.

4.2.3 Disolución de Oxígeno, Nitrógeno y Dióxido de Carbono

El oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono se disuelven en la fase acuosa del tejido. La cantidad disuelta puede calcularse teniendo en cuenta la solubilidad de los gases mencionados en agua, el contenido de humedad del músculo y la concentración de cada uno de esos gases en el aire.

La solubilidad de un gas en agua puede representarse por la ley de Henry:

$$p = H X$$

donde

p = presión parcial del soluto en fase gaseosa (atm.)

X = fracción molar del soluto en fase líquida (moles de soluto/mol de solución)

La variación de la constante de Henry con la temperatura se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15: Constante de Henry (atm.) para oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono en agua (Perry, 1950)

T (°C)	O_2 H x 10^{-4}	N_2 H x 10^{-4}	CO_2 H x 10^{-3}
0	2.55	5.29	0.728
5	2.91	5.97	0.876
10	3.27	6.68	1.04
15	3.64	7.38	1.22
20	4.01	8.04	1.42
40	5.35	10.40	2.33

Considerando que el aire tiene la siguiente composición:

O_2 : 21.0%

N_2 : 78.9%

CO_2 : 0.1%

y que la humedad promedio del tejido cárneo es de 0.74 g de agua/ g tejido, la solubilidad de cada uno de esos gases en carne para distintas temperaturas se indica en la Tabla 16.

Tabla 16: Concentración de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono disueltos en la interfase del tejido cárneo

T(°C)	$C_{SO_2} \left(\frac{cm^3}{g \text{ tejido}} \right) \times 10^3$	$C_{SN_2} \left(\frac{cm^3}{g \text{ tejido}} \right) \times 10^3$	$C_{SCO_2} \left(\frac{cm^3}{g \text{ tejido}} \right) \times 10^3$
0	7.57	13.73	1.27
5	6.64	12.17	1.05
10	5.90	10.88	0.89
20	4.81	9.04	0.65
40	3.61	6.99	0.40

4.2.4 Penetración de Oxígeno en el Tejido (δ)

Una importante consideración en la estimación del consumo de oxígeno debido a la saturación de los fluídos tisulares es la cantidad de muestra expuesta al aire por el corte de una superficie fresca. En el músculo post-mortem el oxígeno se agota rápidamente. El agua en el tejido podría mantener más oxígeno disuelto a 1°C que a la temperatura normal del animal (39°C). Cuando el oxígeno se disuelve en la superficie del tejido tiende a difundir hacia el interior del mismo. Teóricamente, un gas podría difundir a través del tejido hasta saturación completa. Sin embargo, este no es el caso en tanto el oxígeno esté siendo utilizado para oxidaciones en el músculo. Se puede considerar que una cierta porción es utilizada a medida que el oxígeno penetra en el tejido de modo que la cantidad disponible para mayor difusión decrece constantemente. Entonces, la profundidad final que penetraría el oxígeno sería una función de la demanda enzimática (R) y de la cantidad disuelta en el tejido (C_s).

El análisis del problema de difusión unidireccional de oxígeno en pla

ca plana, con simultáneo consumo (orden cero), en estado pseudoestacionario implica la resolución de la ecuación:

$$D \frac{d^2 C}{dx^2} = R \quad (8)$$

donde D es el coeficiente de difusión de oxígeno en el tejido y R es el consumo total de oxígeno por el tejido con las siguientes condiciones de contorno:

$$\begin{aligned} x = 0 & \quad C = C_S \\ x = \delta & \quad \frac{dC}{dx} = 0 \end{aligned}$$

siendo C_S la concentración de oxígeno disuelto en el tejido en la interfase músculo-gas y δ la penetración de oxígeno, a partir de la cual no hay flujo apreciable de gas hacia el interior de la carne. La suposición de C_S constante es válida por el hecho de que la demanda bacteriana en superficie es despreciable y la reducción progresiva de la concentración de O_2 en la atmósfera que rodea al producto no afecta notablemente los valores de δ

La solución de la Ec. (8) conduce al siguiente perfil de concentraciones:

$$C - C_S = \frac{R}{2D} x^2 - \frac{R \delta x}{D} \quad (9)$$

Si se acepta que en $x = \delta$, es a su vez $\frac{C}{C_S} \ll 1$ se obtiene la conocida expresión debida a Warburg que permite estimar la penetración de oxígeno en el músculo en estado pseudoestacionario.

$$\delta = \sqrt{\frac{2 D C_S}{R}} \quad (10)$$

utilizada inicialmente por Brooks (1929).

La concentración promedio de O_2 en el tejido (\bar{C}_{O_2}) se obtiene integrando el perfil de la Ec. (9) a lo largo del espesor δ de penetración:

$$\bar{C} = \int_0^{\delta} \left(C_s + \frac{R}{2D} x^2 - \frac{R \delta x}{D} \right) dx / \delta \quad (11)$$

$$\bar{C} = C_s - \frac{1}{3} \frac{R}{D} \delta^2 \quad (12)$$

La velocidad de difusión de oxígeno es también una función limitante de la penetración. La variación del coeficiente de difusión de oxígeno con la temperatura se puede calcular a partir de datos de dicho coeficiente en músculos: $1.7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{seg}$ a 37°C (Lightfoot, 1974), y aplicando la ecuación de Wilke - Chang:

$$\frac{D}{T} \frac{\mu_w}{\mu} = \text{cte}$$

En la Tabla 17 figuran los valores obtenidos.

Tabla 17: Coeficiente de difusión de oxígeno en el tejido (Bolz y Tuve, 1980)

T(°C)	$D_{O_2\text{-músculo}}(\text{cm}^2/\text{seg}) \times 10^5$	μ_w (cp)
37	1.70	0.705
10	1.00	1.307
5	0.89	1.520
0	0.76	1.787

Un incremento en la temperatura aumenta la velocidad de difusión y la demanda enzimática, mientras que la solubilidad decrece. El efecto neto de un incremento de la temperatura del músculo es una disminución en la profundidad

de penetración (Tabla 18), que resulta en una menor cantidad de tejido expuesto al aire que lo rodea para una dada área superficial.

Tabla 18: Penetración de oxígeno en el tejido

T (°C)	δ (cm)
0	0.32
4	0.26

La profundidad de la penetración de oxígeno también incide en la apariencia de la carne, dado que está determinando a qué distancia de la superficie se forma la capa de metamioglobina .

La Fig. 11 ilustra la formación de los anillos de metamioglobina y su variación con la temperatura. Cuando menor es la temperatura, mayor es la profundidad de estos anillos, los cuales se forman en el punto más alejado de penetración de oxígeno, donde la tensión del mismo es baja.

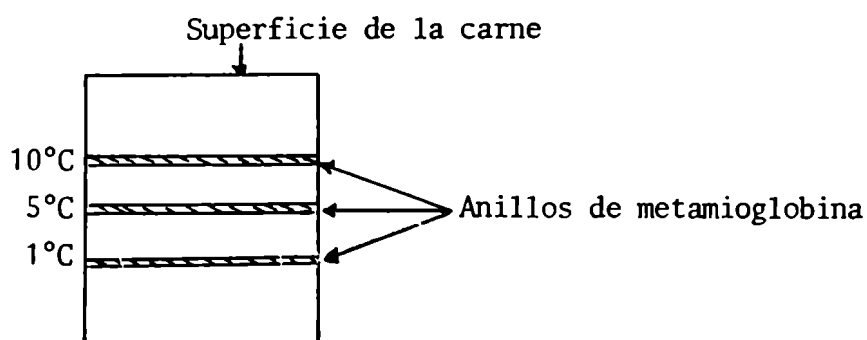


Fig. 11: Carte vertical de un músculo

4.2.5 Producción de Dióxido de Carbono (G)

Durante las primeras horas de envasado se produce una rápida evolución de dióxido de carbono. Urbin y Wilson (1961), explicaron este fenómeno a través de los cambios de pH que ocurren en el músculo post-mortem. El pH nor

mal del tejido en el animal vivo es de 7.2 a 7.4 y luego del rigor mortis está en el rango de 5.6 - 5.8; esto causaría una inversión en la relación de bicarbonato a dióxido de carbono que sería de aproximadamente de 15:1 a pH 7.3 y de 1:2.5 a pH 5.7. Cuando cesa la circulación el tejido no puede intercambiar gases con el medio ambiente que lo rodea. Sin embargo, al cortar el músculo ese intercambio podría realizarse hasta arribar a una nueva condición de equilibrio.

En la Fig. 12 se muestra la evolución de CO_2 en función del tiempo a 1°C .

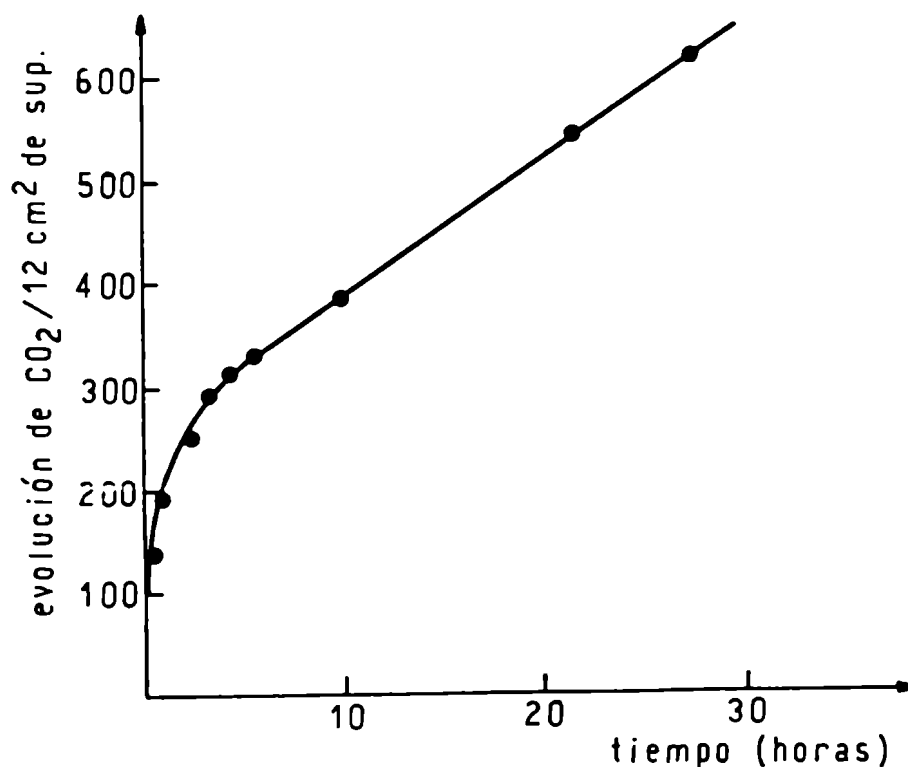


Fig. 12: Evolución de CO_2 a 1°C (Urbin y Wilson, 1961)

4.2.6 Permeabilidad Gaseosa de la Película (P)

Los datos de la permeabilidad gaseosa de la película fueron presentados en el capítulo 2; los mismos resultaron ser pequeños comparados con los valores de los otros parámetros considerados. Por ejemplo, la permeabilidad al oxígeno es de $P_{O_2} = 50 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24 \text{ h}/1 \text{ atm.}/23^\circ\text{C}$; al corregir este valor para 4°C ($Q_{10} = 2$) y una presión parcial de oxígeno de $p_{O_2} = 0.21 \text{ atm}$, la permeabilidad se reduce a $0.011 \mu\text{l O}_2/\text{cm}^2/\text{h}/0.21 \text{ atm}/4^\circ\text{C}$. Resultados similares se obtuvieron para el nitrógeno y CO_2 .

4.3 Representación Matemática de la Evolución de la Atmósfera Gaseosa que Rodea al Músculo a través de Balances de Materia

Para interpretar las modificaciones de la atmósfera gaseosa en el interior de los envases al vacío y poder cuantificarlas, se plantearon los balances de materia para cada uno de los gases en estudio.

Balance de materia para el oxígeno

$$V_g \frac{d \omega_{O_2}}{dt} = J_{O_2} (p_{O_2e} - p_{O_2}) A' - (R_a \delta + R_b A) \rho \quad (13)$$

$$\text{siendo a } t = 0 \quad \omega_{O_2} = \omega_{O_2e} - \frac{\bar{C}_{O_2} A \delta \rho}{V_g}$$

Balance de materia para el dióxido de carbono

$$V_g \frac{d \omega_{CO_2}}{dt} = J_{CO_2} (p_{CO_2e} - p_{CO_2}) A' + G A \delta \rho \quad (14)$$

$$\text{siendo a } t = 0 \quad \omega_{CO_2} = \omega_{CO_2e} - \frac{\bar{C}_{CO_2} A \delta \rho}{V_g}$$

Balance de materia para el nitrógeno

$$V_g \frac{d \omega_{N_2}}{dt} = J_{N_2} (p_{N_2e} - p_{N_2}) A' \quad (15)$$

$$t = 0 \quad \omega_{N_2} = \omega_{N_2e} - \frac{\bar{C}_{N_2} V_C \rho}{V_g}$$

donde: V_g representa el volumen gaseoso en el interior del envase, ω_{O_2} , ω_{CO_2} , ω_{N_2} las fracciones volumétricas en la atmósfera interna y ρ la densidad de la carne.

En el planteo de las ecuaciones se ha admitido la existencia de un estado pseudo-estacionario, donde la penetración de oxígeno δ prácticamente no se modifica entre la primera y sexta horas posteriores al envasado ya que la progresiva disminución de C_s se ve compensada con el decrecimiento de R .

Los valores iniciales de fracción volumétrica (ω) tienen en cuenta la solubilidad gaseosa en los fluidos tisulares e incluyen los valores medios de los perfiles de concentración pseudoestacionarios (\bar{C}) en el caso de O_2 y CO_2 . Para el N_2 , y debido a que no interviene en los procesos enzimáticos se admite que su disolución tiene lugar en toda la pieza cárnea de volumen V_C coincidiendo con el valor de interfase de la Tabla 16 ($\bar{C}_{N_2} = C_{SN_2}$).

En los balances se ha indicado con A el área de tejido expuesto y con A' al área de permeación de los gases a través de la película.

Los balances (13), (14) y (15) pueden simplificarse en base a las consideraciones realizadas de cada uno de los parámetros, reescribiéndose de la siguiente forma:

$$\omega_{O_2} = \omega_{O_2e} - \frac{A \delta \rho}{V_g} \left[\int_0^t (e^{-\gamma t}) dt + \bar{C}_{O_2} \right] \quad (16)$$

$$\omega_{CO_2} = \omega_{CO_2e} + \frac{A \delta \rho}{V_g} (G - \bar{C}_{CO_2}) \quad (17)$$

$$\omega_{N_2} = \omega_{N_2e} - \frac{\bar{C}_{N_2} V_c \rho}{V_g} \quad (18)$$

Estas ecuaciones se utilizaron para obtener la fracción volumétrica de dichos gases después de 6 horas a 4°C, condiciones para las cuales se tienen los resultados de las experiencias.

La relación de volumen de gas a volumen de carne utilizada es igual a $V_g/V_{\text{Carne}} = 0.8$, siendo

$$\begin{aligned} V_c &= 34.65 \text{ cm}^3 \\ V_g &= 27.72 \text{ cm}^3 \\ A &= 76.95 \text{ cm}^2 \\ \delta &= 0.26 \text{ cm} \\ R &= 38.82 \text{ } \mu\text{l O}_2/\text{g} \\ G &= 88.8 \text{ } \mu\text{l CO}_2/\text{g} \\ \rho &= 1.06 \text{ g/cm}^3 \end{aligned}$$

En la Tabla 19 se presentan los valores de \bar{C} ; para calcular el \bar{C}_{CO_2} se consideró un coeficiente respiratorio igual a 1 y en la Ec. (12) a R se le cambió el signo porque ahora se tiene un manantial de CO_2 en lugar de un sumidero de O_2 . (Urbin y Wilson, 1961).

Tabla 19: Concentración promedio de gases en el tejido

	O_2	CO_2	N_2
$\bar{C} \text{ (}\mu\text{l/g)}$	3.86	2.78	12.17

Los resultados obtenidos a través de los balances (ω) se indican en la Tabla 20, donde también se incluyeron los datos experimentales (ω_{exp}). Para simplificar las ecuaciones, se consideró que el volumen total de gases era

constante si bien existe una pequeña variación debida a la rápida producción inicial de CO_2 . Teniendo en cuenta esa variación el error final que se comete es inferior al indicado en la Tabla.

Tabla 20: Composición de la atmósfera gaseosa del interior de un envase de carne luego de 6 horas de almacenamiento (Valores teóricos y experimentales)

	O_2	CO_2	N_2
ω (%)	17.91	6.31	77.38
ω_{exp} (%)	18.72	6.34	74.94
Error (%)	4.33	0.47	3.15

Comparando los valores teóricos (calculados a través de los balances) con los experimentales (medidos cromatográficamente), se puede observar que se obtuvo una satisfactoria coincidencia entre ambos resultados, lo cual implica una correcta estimación de los parámetros intervinientes en las ecuaciones.

CAPITULO 5

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SORBATO DE POTASIO SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO

Los datos experimentales de los recuentos microbianos ($\log \text{UFC/cm}^2$) correspondientes a muestras tratadas con sorbato de potasio y los de sus respectivos controles, para las diferentes condiciones de almacenamiento se presentan en las tablas del Apéndice 4 en función del tiempo y para músculos provenientes de distintos animales.

Se ha incluido en cada caso los parámetros correspondientes a la regresión lineal de los recuentos durante el período de crecimiento exponencial, el coeficiente de correlación y el desvío standard de la regresión. El análisis de la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos fue realizado de acuerdo con el método de Neter y Wasserman (1974) según se describe en el Apéndice 3 b. En las representaciones gráficas se han incluido todos los datos experimentales; las líneas llenas corresponden a la unión de los valores promedios para los distintos períodos de almacenamiento y la regresión lineal de dichos datos se ha representado por medio de línea de trazos.

5.1 Carnes Bovinas Envasadas en Películas Permeables al Oxígeno

En la Fig. 13 se representaron los resultados de los recuentos aeróbicos de las muestras envasadas en polietileno y almacenadas a 0°C ($\text{pH} = 5.70$), rociadas con soluciones de sorbato de potasio en un rango de concentraciones comprendido entre el 0.30% y 3.00% (Ap. 4 Tabla I). No se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos con 0.30, 0.43, 0.50% de sorbato respecto de las muestras control.

Si bien se logra extender el tiempo de vida útil desde 14 días (control) hasta aproximadamente 22 días (sorbato 3%), el color de la carne está totalmente deteriorado a los 21 días de almacenamiento, lo que se muestra en la Tabla 21 a través de la notable disminución del parámetro "a" de la escala Hunter. Por

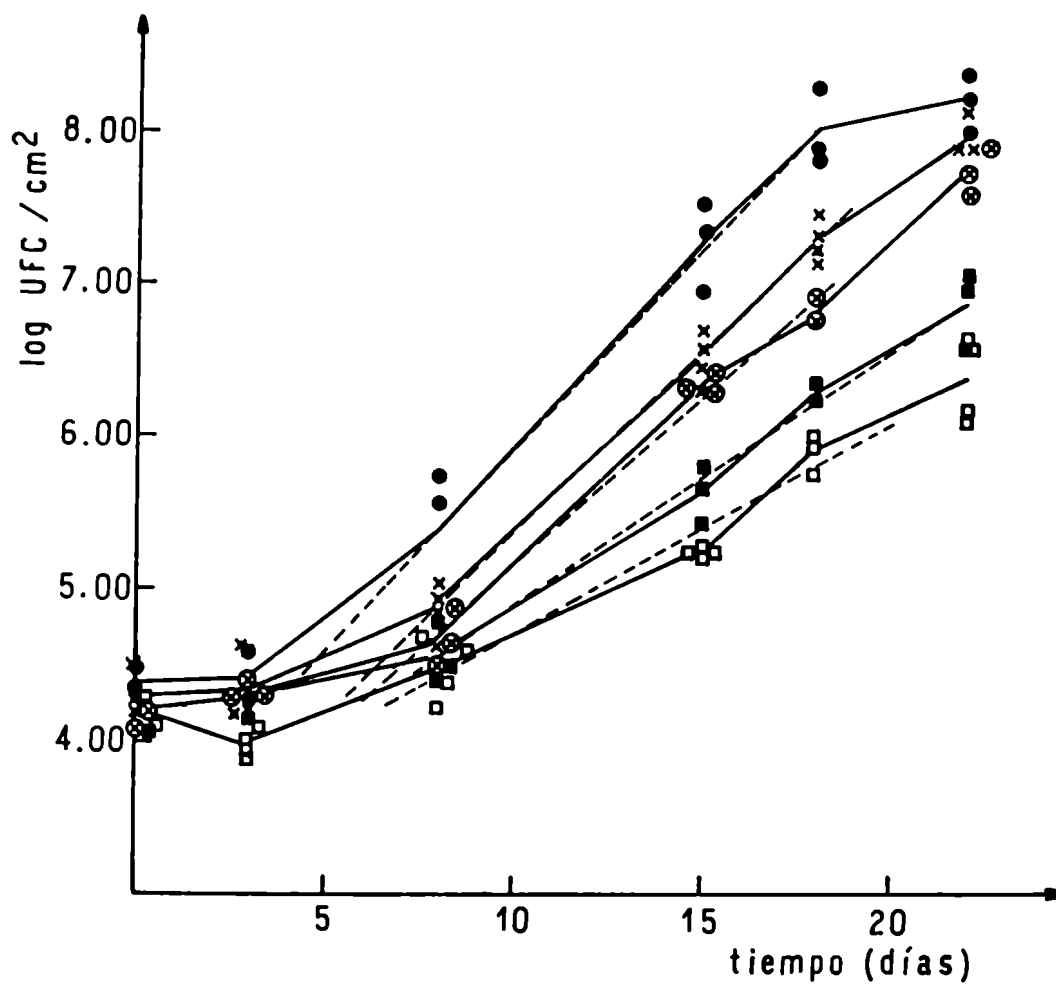


Fig. 13: Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de los microorganismos totales durante el almacenamiento en Polietileno a 0°C - pH de la carne = 5.70

Concentración de las soluciones de sorbato (%):

—●— control

—x— 0.76

—⊗— 1.00

—■— 2.70

—□— 3.00

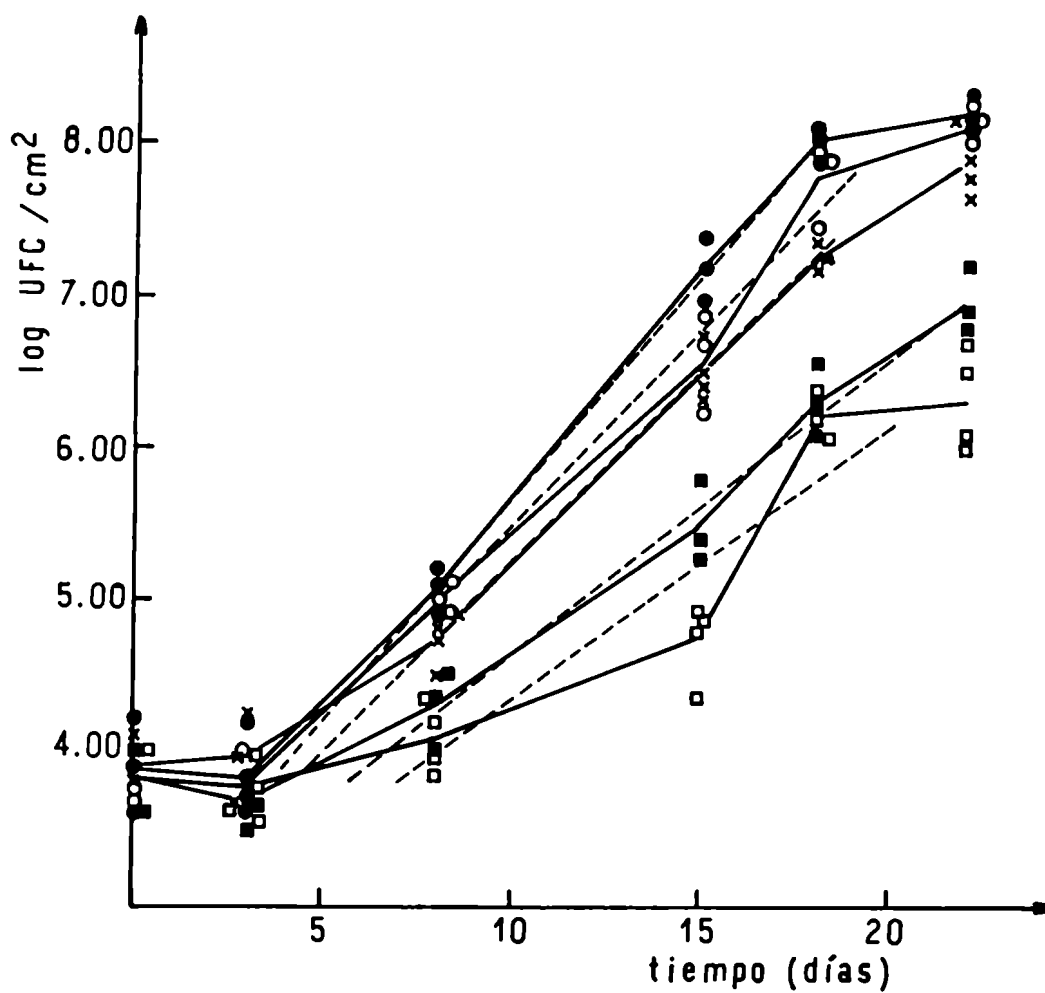


Fig. 14: Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de *Pseudomonas* sp. durante el almacenamiento en polietileno a 0°C - pH de la carne = 5.70

Concentración de las soluciones de sorbato (%):

- | | | |
|-------------|----------|----------|
| -●- control | -○- 0.43 | -x- 0.76 |
| -■- 2.70 | -□- 3.00 | |

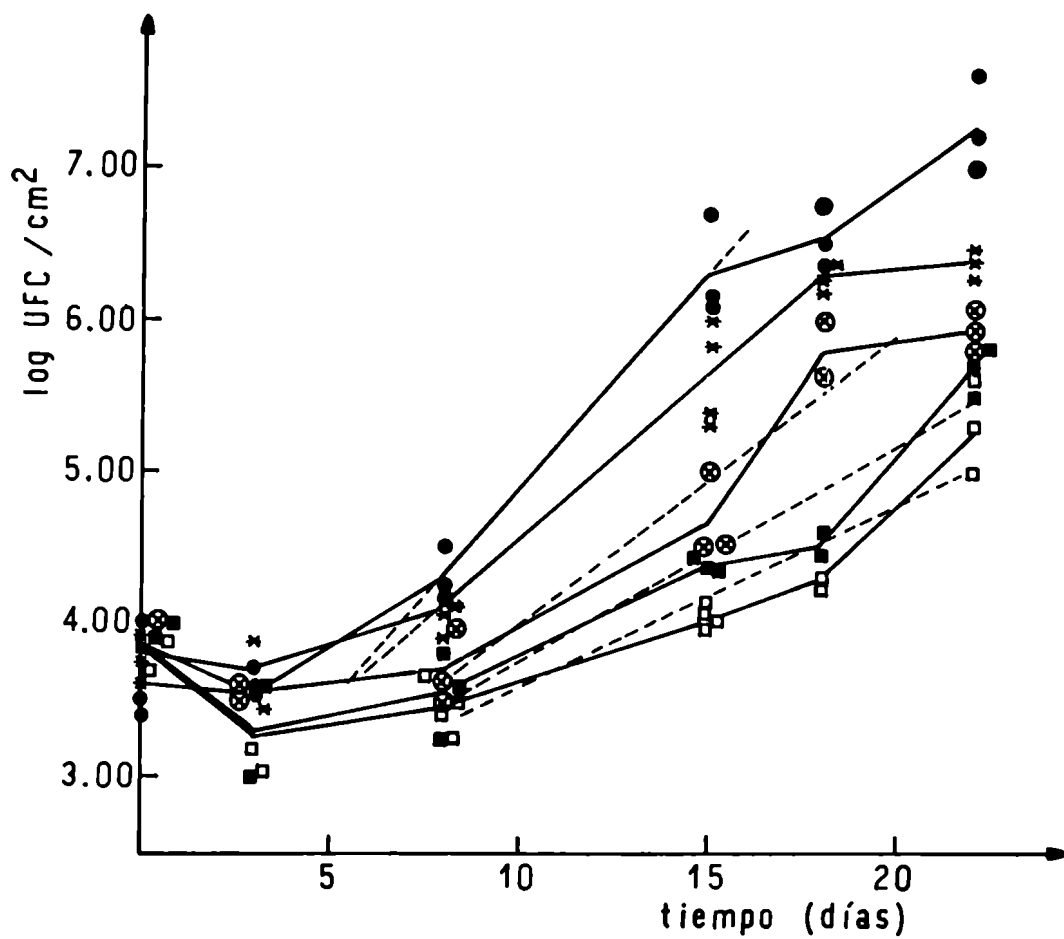


Fig. 15: Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de *B.thermosphacta* durante el almacenamiento en polietileno a 0°C - pH de la carne = 5.70

Concentración de las soluciones de sorbato (%):

- | | | |
|-----------|--------|--------|
| ● control | × 0.50 | ⊗ 1.00 |
| ■ 2.70 | □ 3.00 | |

lo tanto cuando se utilizan películas permeables al oxígeno no se justifica el empleo de preservadores pues el color se deteriora antes que la población microbiana alcance valores de 10^7 UFC/cm².

Al final del almacenamiento los microorganismos que se hallaban en mayor proporción eran Pseudomonas sp. y B. thermosphacta, representándose en las Fig. 14 y 15, respectivamente, los recuentos de estas bacterias en función del tiempo. En esas figuras se puede ver que el sorbato inhibe en forma mucho más acentuada a B. thermosphacta (catalasa positivo), que a Pseudo-monas sp. comprobándose de esta manera la acción selectiva de la sustancia preservadora (Apéndice 4, Tablas II y III).

La acción del sorbato sobre las bacterias mencionadas se vio reflejada tanto en la fase de latencia como en la velocidad de crecimiento. Greer (1982) determinó que el sorbato extiende la vida útil de la carne bovina por prolongación de la fase de latencia de los microorganismos sin afectar la velocidad de crecimiento. Sin embargo Robach (1978) determinó que la acción se manifiesta sobre ambos parámetros.

En el caso de polietileno a 4°C el deterioro del color es mucho más pronunciado que a 0°C y por lo tanto tampoco es aconsejable el empleo de una sustancia conservadora.

Tabla 21: Coloración superficial en carnes tratadas con Sorbato de potasio (3%) y almacenadas en polietileno a 0°C

	Días de Almacenamiento	L	a	b
CONTROL	0	30.64	17.40	9.50
	21	32.22	10.24	7.56
	29	36.50	9.40	7.50
SORBATO 3 %	21	38.00	12.00	10.50
	29	37.10	9.80	9.93

5.2 Carnes Bovinas Almacenadas en Películas de Baja Permeabilidad al Oxígeno

En las Fig. 16a, b, c, d y e se graficó el $\log \text{UFC/cm}^2$ versus tiempo para los recuentos de microorganismos totales de las muestras envasadas en la película de baja permeabilidad al oxígeno y almacenadas a 4°C. Cada figura corresponde a un distinto pH de la carne, en el intervalo comprendido entre 5.70 y 6.20. Las concentraciones de sorbato utilizadas cubren el rango desde el 0.21 % hasta el 10%. (Apéndice 4, Tablas IV a, b, c, d, y e).

No se detectaron cambios de pH por efecto de la solución preservadora, aún a altas concentraciones debido a que el músculo se comporta como un sistema buffer.

A través de los resultados se pone de manifiesto el mayor poder inhibidor del ácido sórbico a bajos pH. Por ejemplo, si se comparan los tiempos necesarios para alcanzar recuentos totales de $6.75 (\log \text{UFC/cm}^2)$, se observa que las muestras de carne con un pH de 5.70, 5.80 y 5.90, rociadas con una solución de sorbato al 5%, tardan 32, 26 y 21 días respectivamente. Además, cuando se emplea una solución al 10%, con un pH de la carne igual a 5.70, la fase de latencia se prolonga los 38 días que dura la experiencia, en cambio a pH 6.20 (Fig. 16e) se necesitan 23 días para llegar a obtener recuentos de 10^7 UFC/cm^2 .

En las Figs. 17 a 21 se muestra la acción de la concentración de sorbato y el pH de la carne sobre el crecimiento de los distintos microorganismos que desarrollan en el músculo cárnico. En el caso de Lactobacillus sp. (Apéndice 4, Tablas V a, b, c, Fig. 17a, b, c) el efecto se ve reflejado tanto en la fase de latencia como en la velocidad de crecimiento. La mayor inhibición se obtiene sobre B. thermosphacta (Apéndice 4, Tablas a, b, c, Fig. 18a, b, c) en donde además se ven disminuidos los niveles alcanzados; ésto último también ocurre con las enterobacterias (Ap. 4, Tabla VII a y b, Fig. 20a y b) y las levaduras

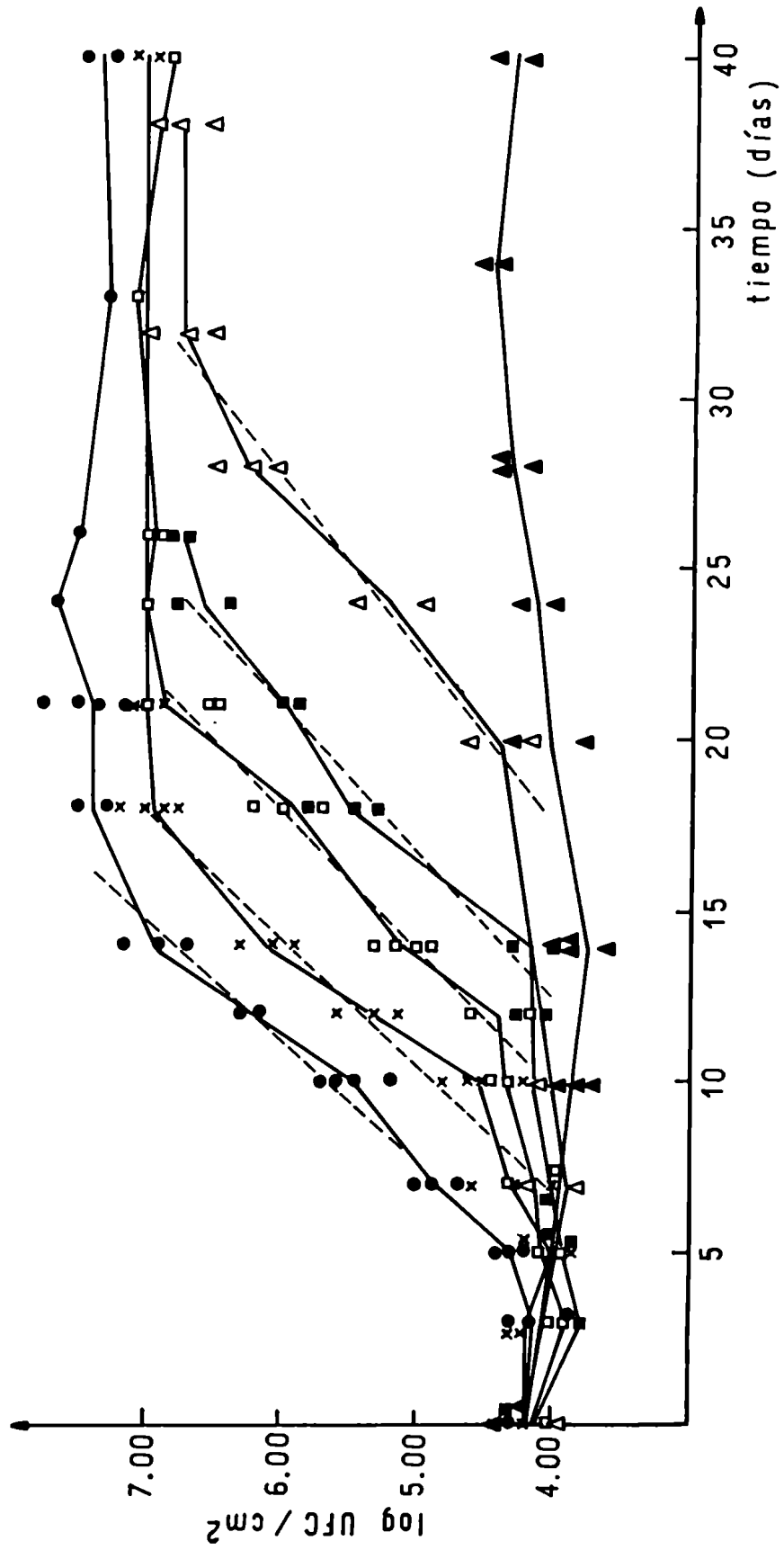


Fig. 16 a

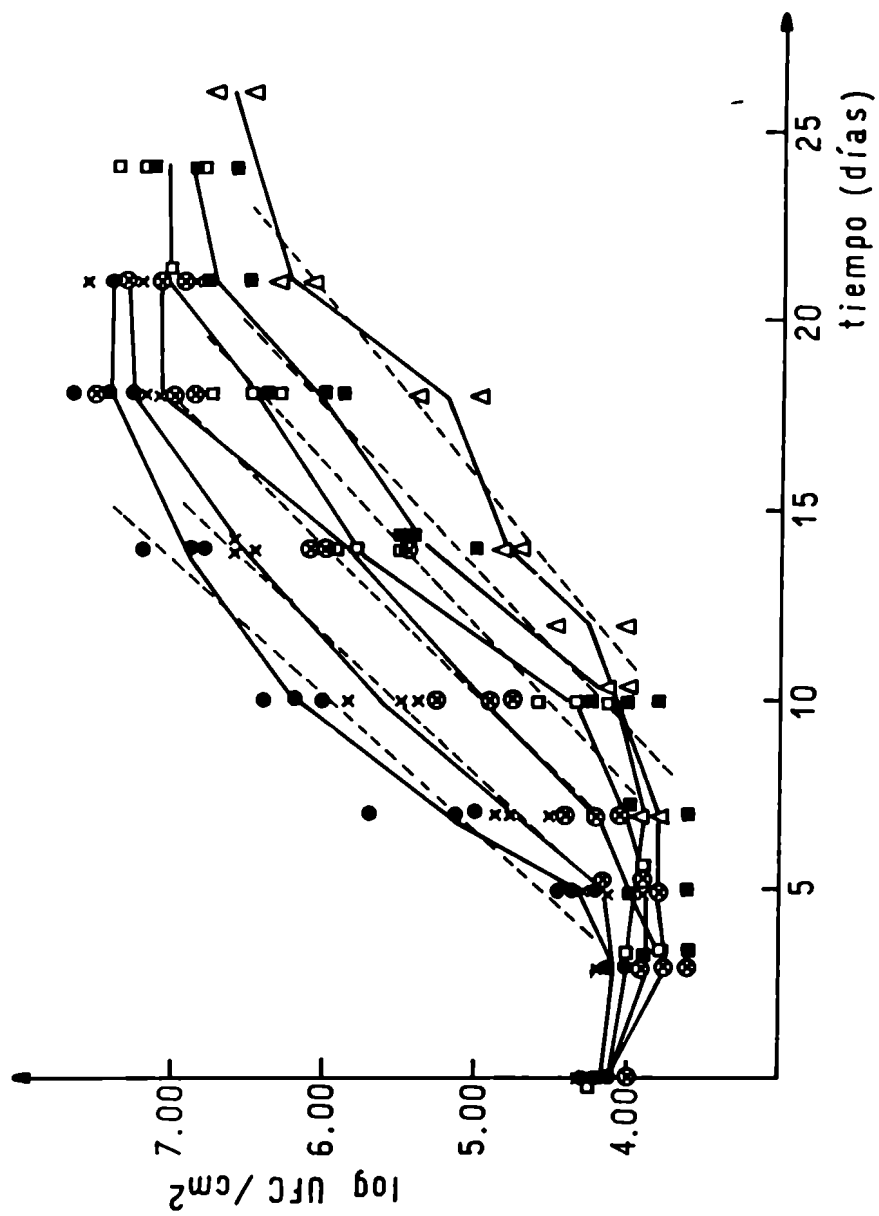


Fig. 16 b

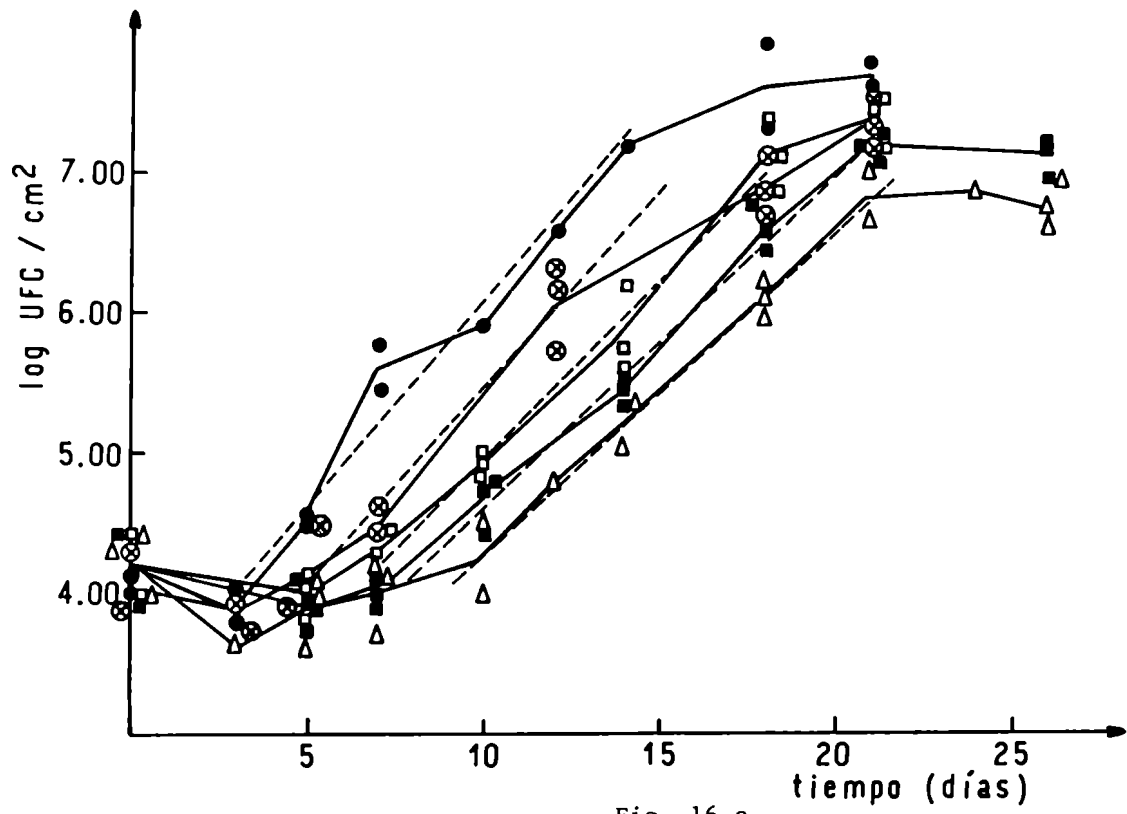


Fig. 16 c

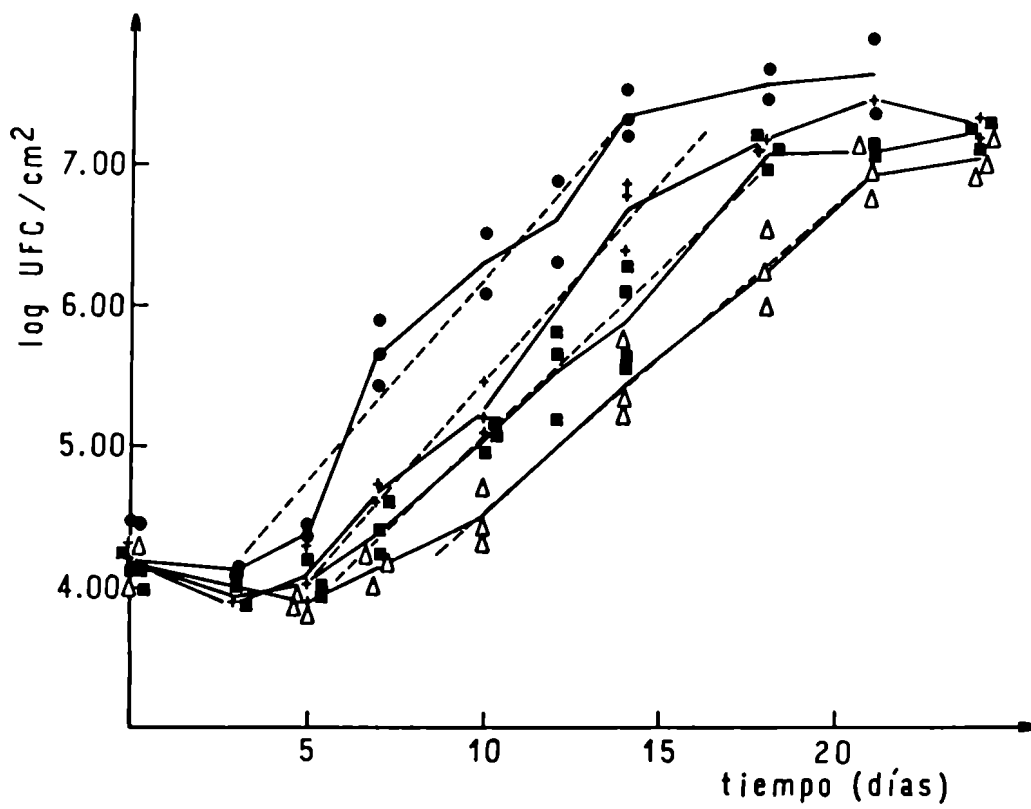


Fig. 16 d

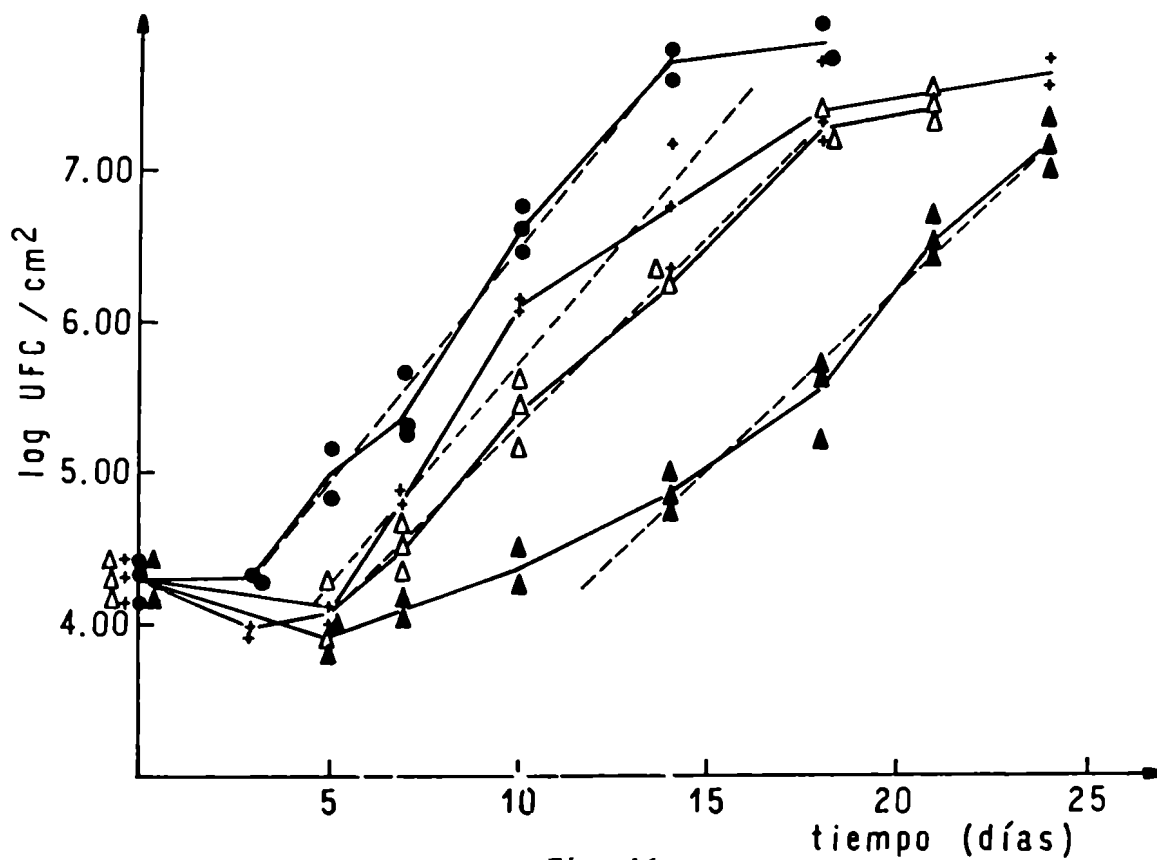


Fig. 16 e

Fig 16: Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de los microorganismos totales durante el almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C .

Concentración de las soluciones de sorbato (%) :

-●- control -x- 0.76 -●- 1.0 -+- 2.0

-□- 3.0 -■- 4.0 -△- 5.0 -▲- 10.0 .

pH de la carne : a) 5.70, b) 5.80 c) 5.90 d) 6.00

e) 6.20 .

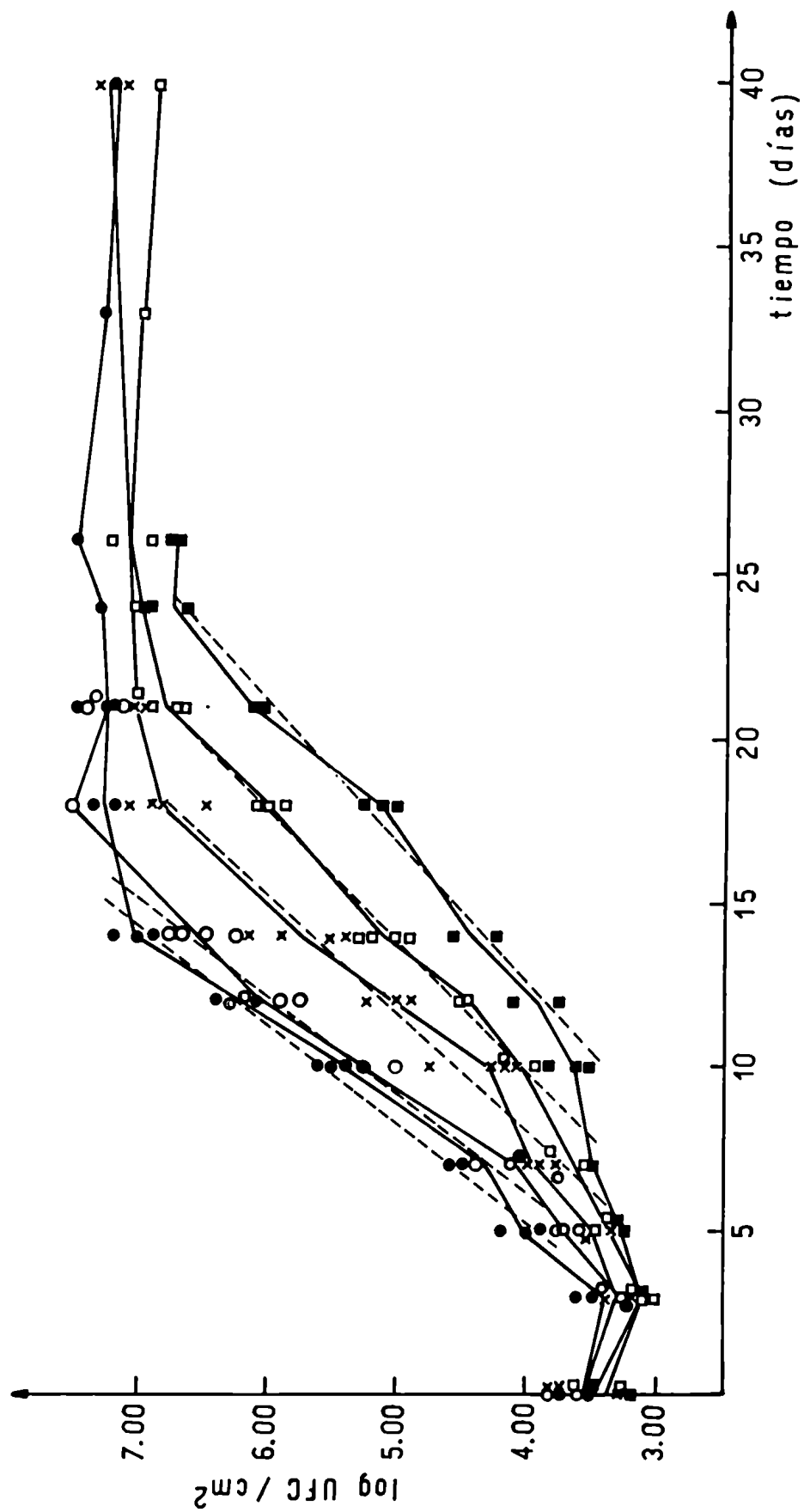


Fig. 17 a

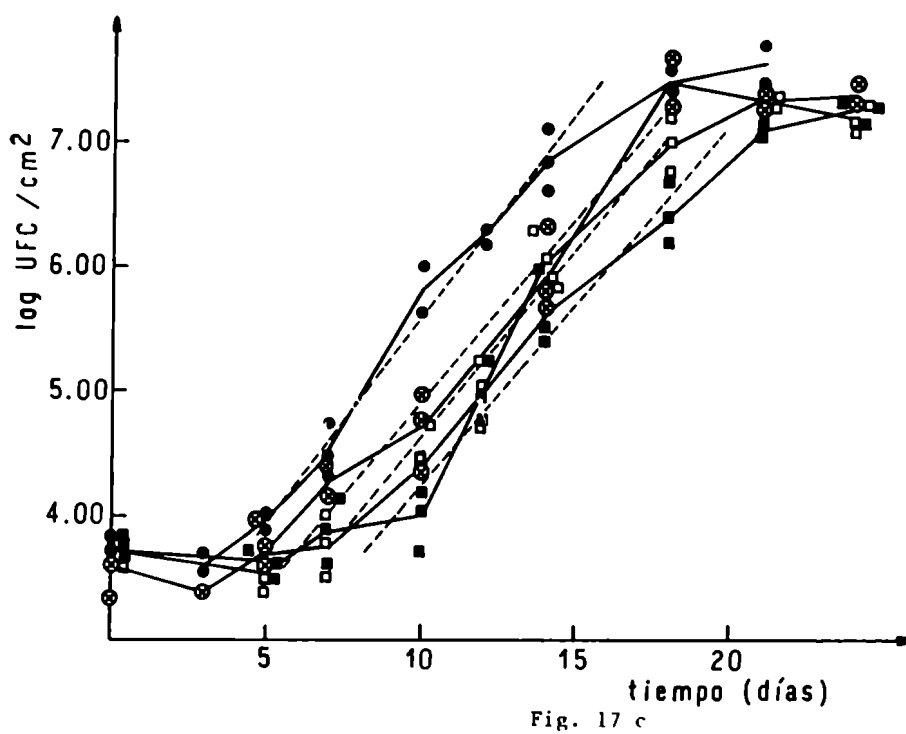
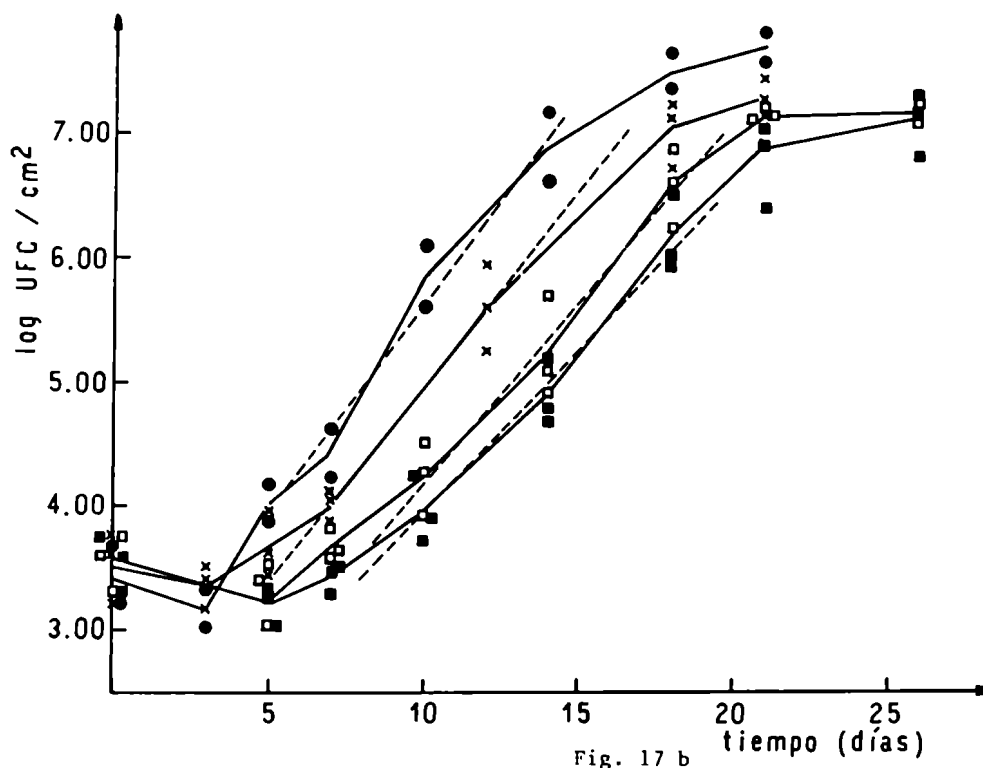


Fig. 17: Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de *Lactobacillus* sp. durante el almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C

Concentración de las soluciones de sorbato (%):

● control ○ 0.43 × 0.76 ⊗ 1.0
 □ 3.0 ■ 4.0

pH de la carne: a) 5.70 b) 5.90 c) 6.00

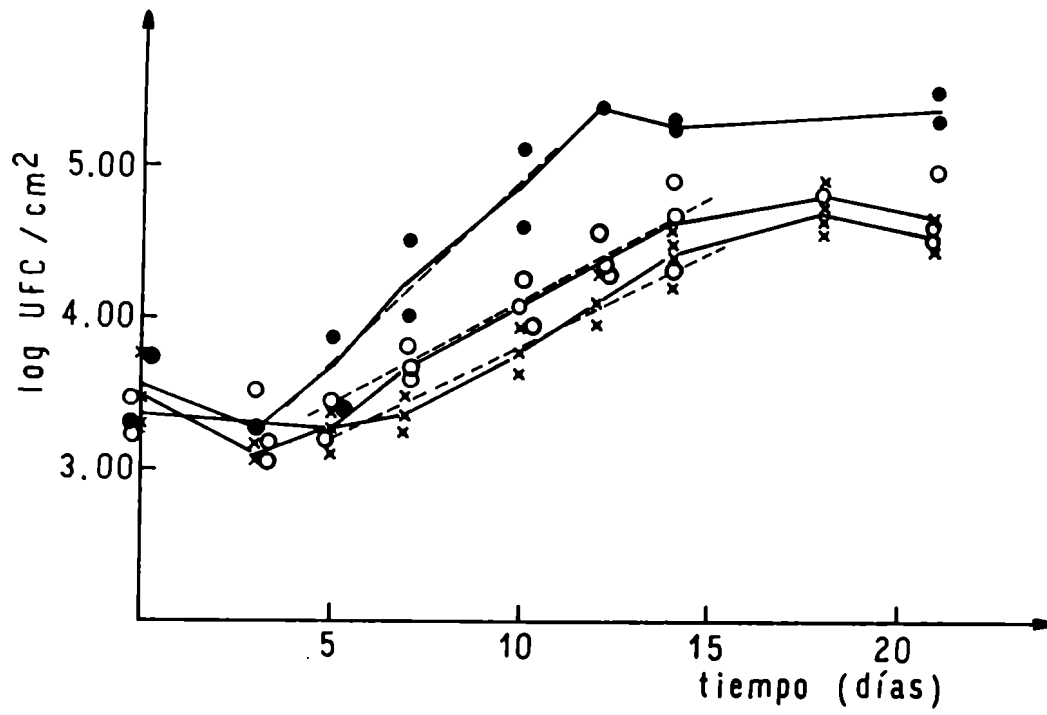


Fig. 18 a

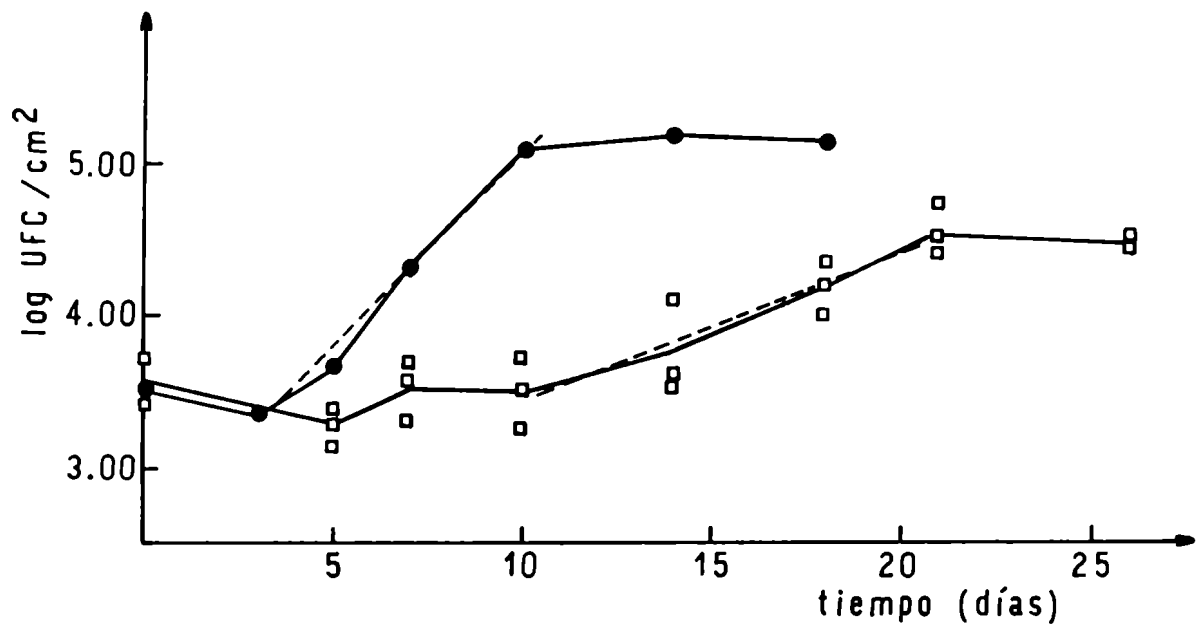


Fig. 18 b

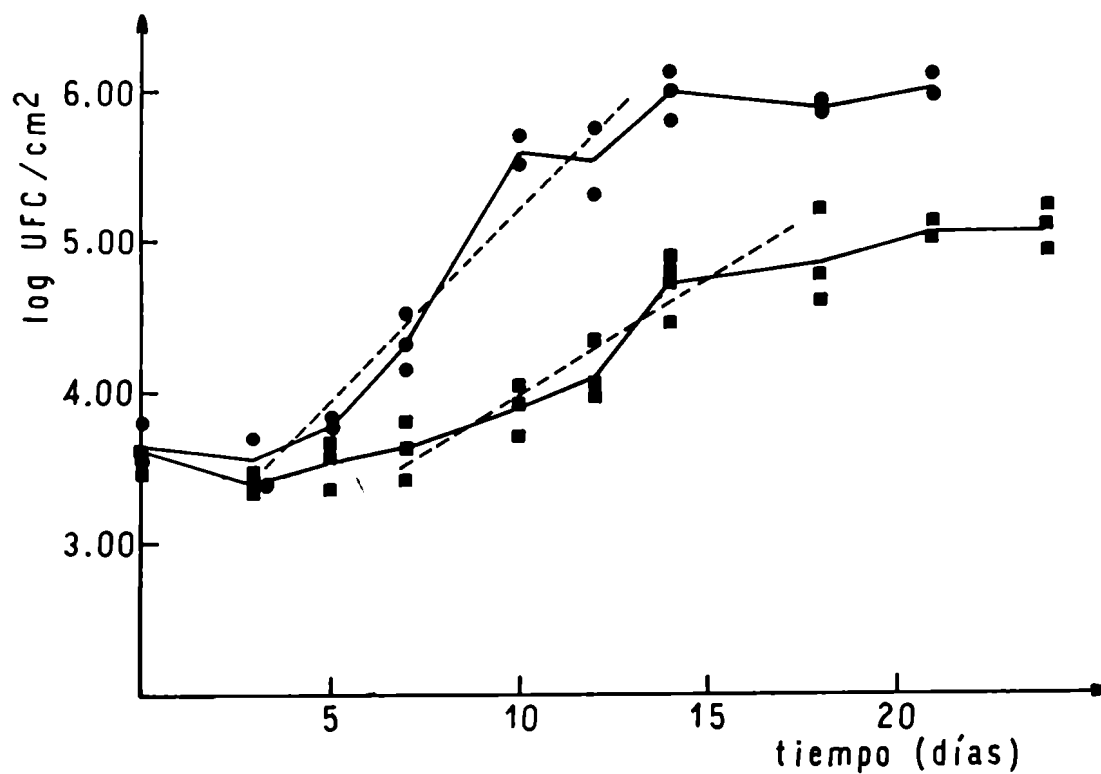


Fig. 18 c

Fig. 18: Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de *B. thermosphacta* durante el almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C .

Concentración de las soluciones de sorbato (%) :

—●— control —○— 0.43 —×— 0.76 —□— 3.0 —■— 4.0
pH de la carne: a) 5.70 b) 5.90 c) 6.00 .

(Ap. 4, Tabla IX, Fig. 21). Sobre Pseudomonas sp. (Ap. 4, Tabla VIII a, b, c, Fig. 19a, b, c) se observa especialmente una marcada extensión de la fase de latencia.

El color (Tabla 22) se mantiene inalterable por más de 38 días cuando se utiliza sorbato al 5%, pero si se emplea una solución al 3% al cabo de 33 días de almacenamiento ya se observa una reoxigenación más lenta y valores de "a" (parámetro que mide el color) inferiores a los iniciales. A los 42 días, tanto en el control como en las muestras rociadas con una solución de sorbato al 0.76 y 3% , se detectaron olores desagradables.

Tabla 22: Coloración superficial - EVA-SARAN-EVA 4°C

	Días de Almacenamiento	L	a	b
CONTROL	0	30.20	17.10	8.50
	26	32.90	17.00	8.50
	33	33.20	14.30	8.68
	42	39.76	8.21	8.69
SORBATO 5%	38	36.20	18.50	11.70
SORBATO 3 %	26	36.40	18.40	11.60
	29	39.05	18.18	10.86
	33	36.10	16.06	11.48
	42	42.85	11.15	10.88
SORBATO 0.76 %	6	34.23	17.08	9.73
	20	31.40	16.98	9.10
	46	36.57	11.00	8.96

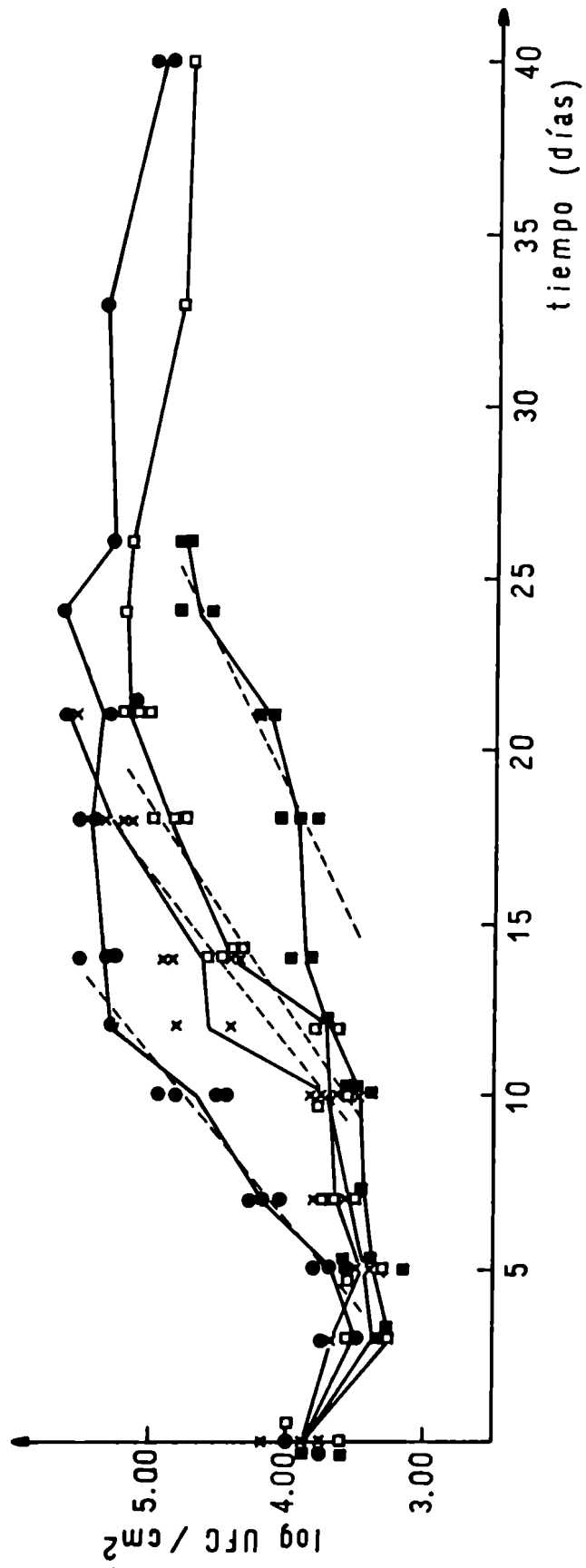


Fig. 19 a

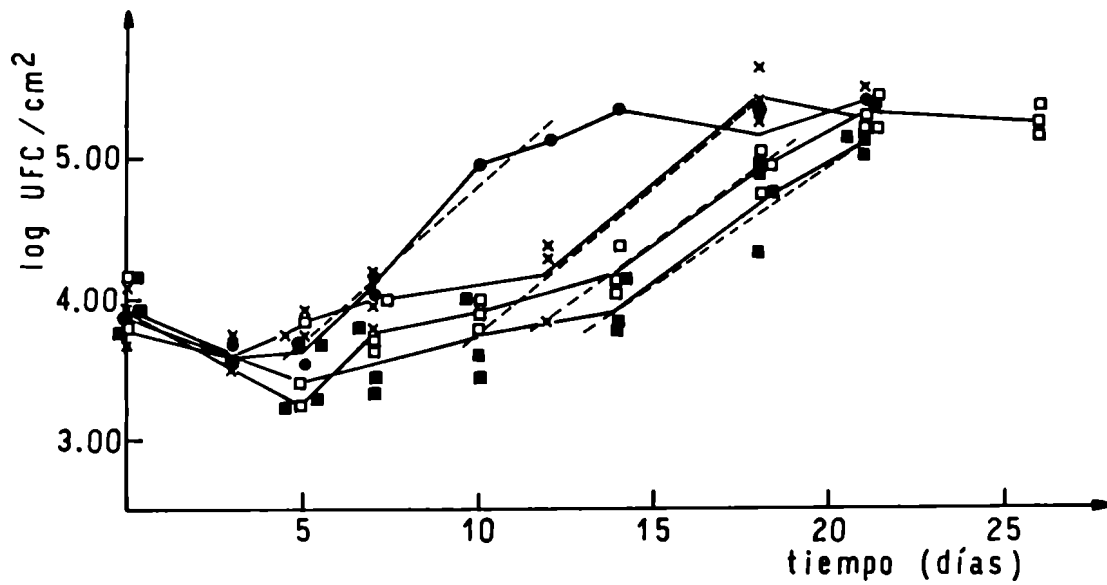


Fig. 19 b

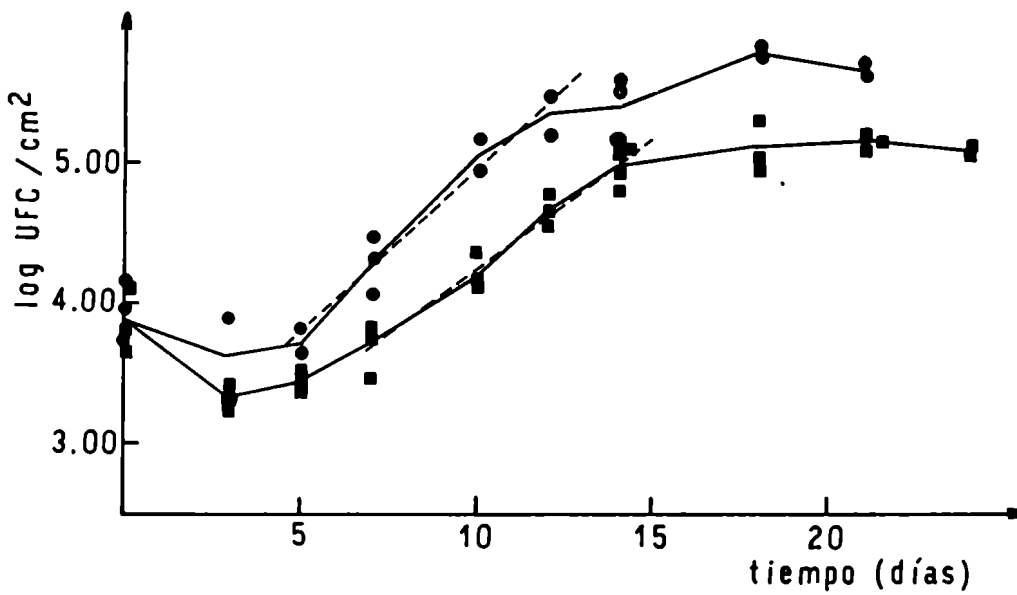


Fig. 19c .

Fig. 19: Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de *Pseudomonas* sp. durante el almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C .

Concentración de las soluciones de sorbato (%) :

-●- control -x- 0.76 -□- 3.0 -■- 4.0

pH de la carne: a) 5.70 b) 5.90 c) 6.00 .

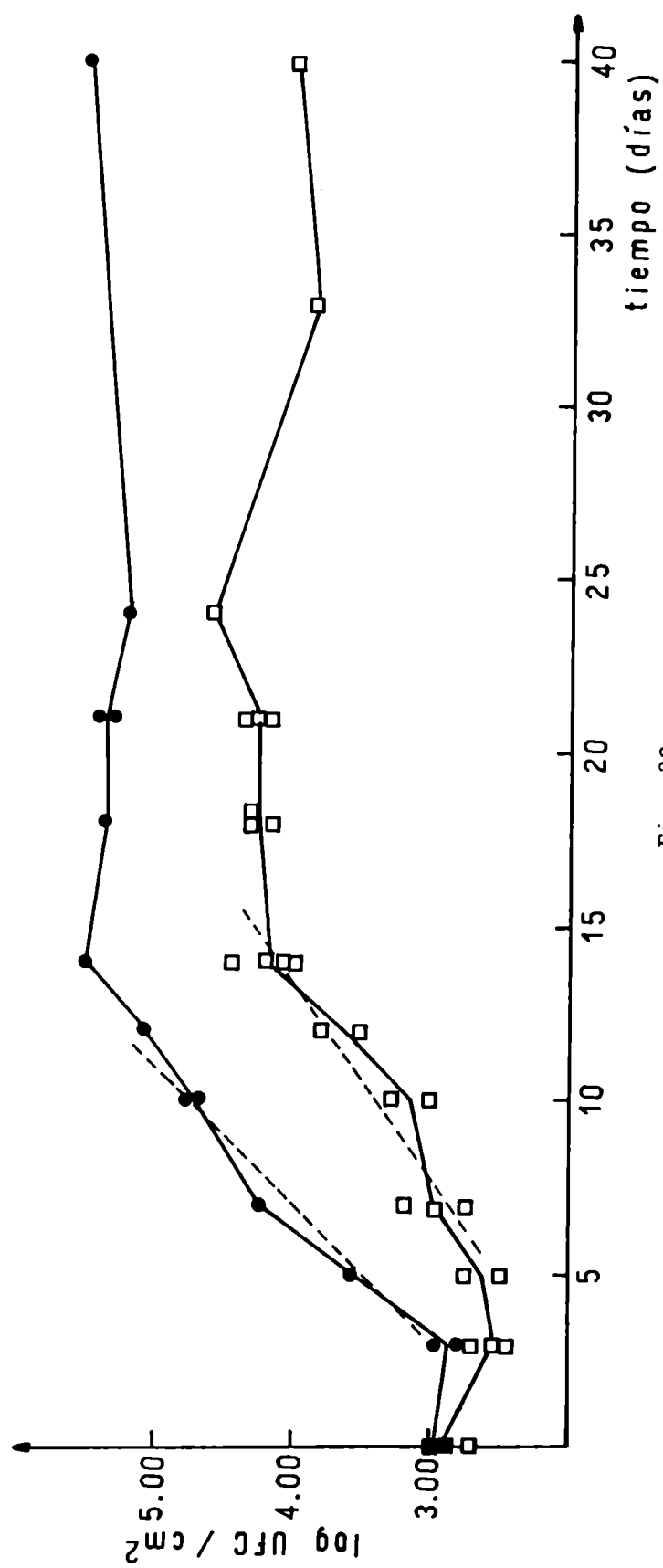


Fig. 20 a

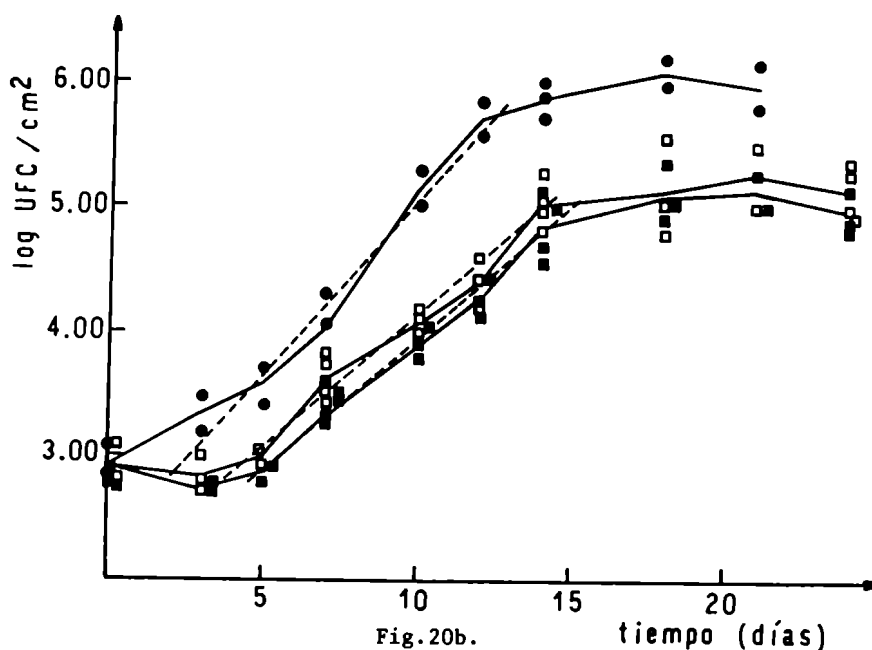


Fig. 20: Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de *Enterobacteriaceae* durante el almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C .
Concentración de las soluciones de sorbato (%) :
● control □ 3.0 ■ 4.0
pH de la carne: a) 5.70 b) 6.00 .

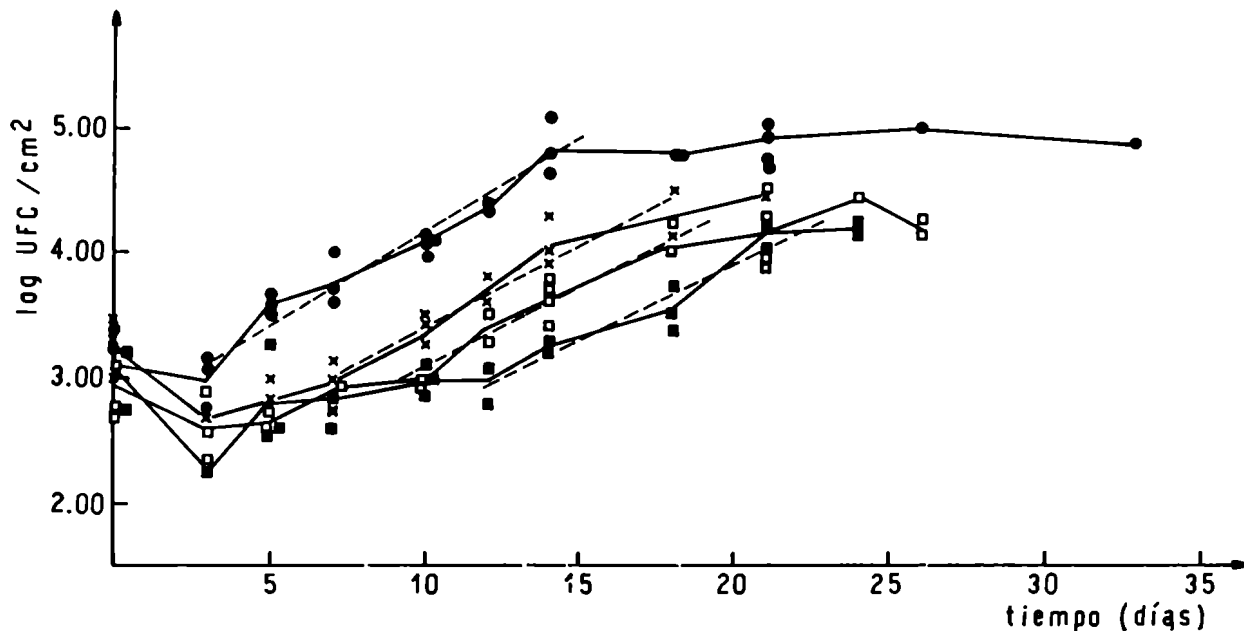


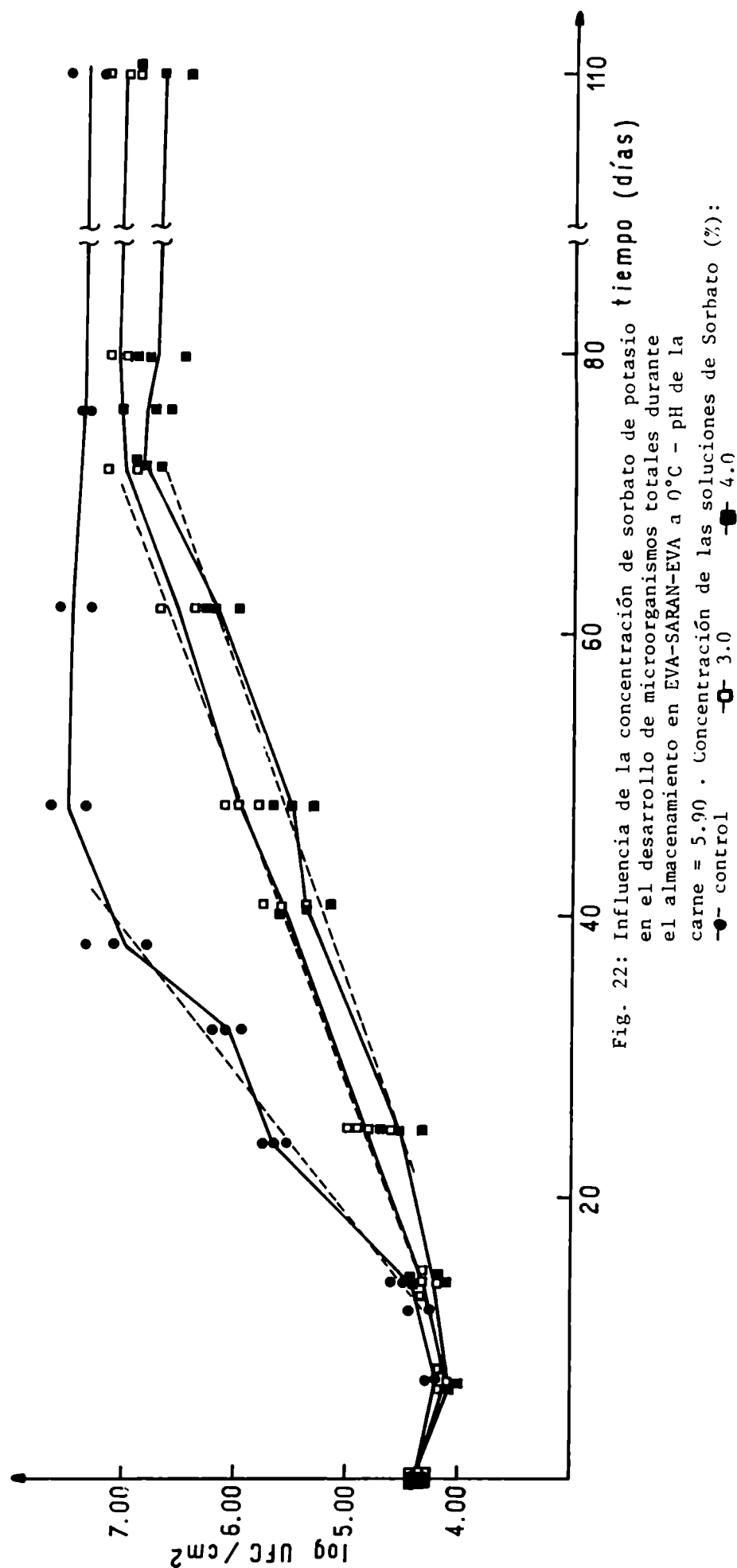
Fig. 21: Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de levaduras - pH de la carne = 5.70.
Concentración de las soluciones de sorbato (%) :
● control × 0.76 □ 3.0 ■ 4.0

El efecto de una disminución de la temperatura de almacenamiento se representa en la Fig. 22 (Ap. 4, Tabla X), donde se graficaron los recuentos totales obtenidos para el caso de EVA-SARAN-EVA a 0°C y soluciones de sorbato del 3% y 4% (pH de la carne 5.90). En la figura mencionada puede observarse que el tiempo necesario para alcanzar recuentos de 10^7 UFC/cm² cuando se emplea una solución al 4% es aproximadamente el doble del correspondiente al control. Si se realiza la misma comparación a 4°C, el tiempo del control no llega a duplicarse indicando una mayor efectividad del preservador al descender la temperatura. Esto coincide con las experiencias realizadas por Cunningham (1981), quien estudió la acción del sorbato de potasio en pollo a 4°, 10° y 22°C, encontrando que soluciones al 5% y 10% eran igualmente efectivas a 4°C pero no a 22°C.

A los 78 días de almacenamiento el color (Tabla 23) de la carne con preservador (3% y 4%) se mantiene inalterable, no así el control que fue rechazado por presentar signos de deterioro. Luego de 110 días tanto el color como el olor de las muestras con preservador fueron inaceptables a pesar de que los recuentos no superaban el valor de 10^7 UFC/cm².

Tabla 23: Coloración superficial - EVA-SARAN-EVA 0°C

	Días de Almacenamiento	L	a	b
CONTROL	0	40.15	19.75	11.42
	48	39.78	18.00	11.51
	63	39.14	17.10	11.62
SORBATO 3 %	48	41.30	18.10	11.70
	63	38.50	18.10	11.90
	78	36.40	17.00	11.00
	110	30.01	9.92	6.08



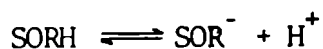
5.3 Análisis de la Acción Inhibitoria del Sorbato de Potasio

Los ácidos débiles actúan como inhibidores del crecimiento microbiano no mostrando una clara dependencia del pH y siendo menos efectivos cuando el pH aumenta. Se ha asumido, comunmente, que el ácido sórbico y otros ácidos débiles muestran actividad antimicrobiana solamente en el estado no disociado (Sofos y Busta, 1981). Este punto de vista implica que la mínima concentración inhibitoria para tales ácidos es fuertemente dependiente del pH. Si se conoce esa concentración para el ácido no disociado, entonces la mínima concentración inhibitoria para el ácido total puede ser calculada como una función del pH y la constante de disociación. Este postulado de la dependencia del pH no siempre se cumple. Varios autores han mostrado que la acción de los ácidos débiles está menos influenciada por los cambios de pH que la sostenida por el modelo descripto (Sheu y col., 1975; Anderson y col, 1980; Reinhard y Radler, 1981).

Eklund (1980; 1983) demostró la eficiencia antimicrobiana de las formas disociada y no disociada del ácido sórbico y propuso un modelo matemático que tiene en cuenta el aporte de ambas. Si bien la acción de la molécula no disociada es de 10-600 veces mayor que la de la disociada, ésta última causa más del 50% de inhibición del crecimiento a niveles de pH superiores a 6.

5.3.1 Modelo Matemático Basado en la Acción Inhibitoria del Acido no Disociado

Dado que ácido sórbico es un ácido débil se establece el siguiente equilibrio:



cuya constante de disociación es

$$K = \frac{[H^+][SOR^-]}{[SORH]} \quad (19)$$

En forma logarítmica la ecuación (19) puede se expresada como

$$\log [H^+] + \log [SOR^-] - \log [SORH] = \log K \quad (20)$$

o en forma equivalente a:

$$\log \frac{[SOR^-]}{[SORH]} = pH - pK \quad (21)$$

resultando

$$\frac{[SOR^-]}{[SORH]} = 10^{pH - pK} \quad (22)$$

Designando con f la relación entre el ácido no dissociado y el total de ácido, se obtiene:

$$f = \frac{[SORH]}{[SOR^-] + [SORH]} = \frac{1}{\frac{[SOR^-]}{[SORH]} + 1} \quad (23)$$

en donde al introducir la Ec. (22) se llega a

$$f = \frac{1}{10^{pH - pK} + 1} \quad (24)$$

La actividad antimicrobiana del ácido sórbico se representa a través del parámetro m.c.i. (mínima concentración inhibitoria). El valor de m.c.i. se determina como la concentración de ácido sórbico que produce un índice de inhibición $I = 0.5$

Asimismo el índice de inhibición se define como:

$$I = 1 - \frac{t_{\text{control}}}{t_{\text{trat.}}} \quad (25)$$

siendo t_{control} = tiempo necesario para aumentar la población microbiana de las muestras en un ciclo logarítmico cuando no se utiliza preservador y $t_{\text{trat.}}$ el correspondiente a las tratadas con sorbato.

$I = 1$ significa inhibición total

$I = 0$ corresponde al caso en que no se producen diferencias respecto del control.

El modelo tradicional atribuye actividad antimicrobiana a la parte no disociada exclusivamente luego

$$(m.c.i.)_{n,dis.} = m.c.i. \cdot f = cte \quad (26)$$

Reemplazando la Ec. (24) en la Ec. (26) resulta:

$$m.c.i. = (m.c.i.)_{n,dis.} (10^{pH - pK} + 1) \quad (27)$$

5.3.2 Modelo Basado en la Acción Inhibitoria de las Fracciones Disociada y no Disociada del Acido

Si se atribuye acción inhibitoria a las fracciones disociada y no disociada (Eklund, 1983) se debe definir la mínima concentración inhibitoria para dichas fracciones ($m.c.i._{dis}$, $m.c.i._{no\ dis.}$)

$$m.c.i. = \phi_{n,dis} [SORH]^{m.c.i.} + \phi_{dis} [SOR^-]^{m.c.i.} \quad (28)$$

donde:

$$\phi_{n,dis.} = \frac{m.c.i.}{(m.c.i.)_{n,dis.}} \quad (29)$$

con $(m.c.i.)_{n,dis.}$ = mínima concentración inhibitoria si el ácido estuviera totalmente no disociado.

$$\phi_{dis} = \frac{m.c.i.}{(m.c.i.)_{dis}} \quad (30)$$

con $(m.c.i.)_{dis}$ = mínima concentración inhibitoria si el ácido estuviera totalmente disociado.

además debe cumplirse:

$$m.c.i. = [SORH]^{m.c.i.} + [SOR^-]^{m.c.i.} \quad (31)$$

que en términos de las relaciones entre el ácido no disociado y el total (f) resultan:

$$[SORH]^{m.c.i.} = m.c.i. \cdot f \quad (\text{concentración de ácido no disociado presente en la condición de m.c.i.})$$

$$[SOR^-]^{m.c.i.} = m.c.i. \cdot (1 - f) \quad (\text{concentración de ácido disociado presente en la condición de m.c.i.})$$

reemplazando en (28) se obtiene:

$$m.c.i. \cdot f \cdot \frac{m.c.i.}{(m.c.i.)_{n.dis}} + m.c.i. \cdot (1 - f) \cdot \frac{m.c.i.}{(m.c.i.)_{dis}} = m.c.i. \quad (34)$$

que finalmente se reduce a:

$$\frac{f}{(m.c.i.)_{n.dis}} + \frac{(1 - f)}{(m.c.i.)_{dis}} = \frac{1}{m.c.i.} \quad (35)$$

$$\text{Llamando } k_{n.dis} = (m.c.i.)_{n.dis} \quad (36)$$

$$\text{y } k_{dis} = (m.c.i.)_{dis} \quad (37)$$

$$\text{se llega } \frac{1}{m.c.i.} = \frac{f}{k_{n.dis}} + \frac{(1 - f)}{k_{dis}} \quad (38)$$

5.3.3 Determinación del Índice de Inhibición y de la Mínima Concentración Inhibitoria en Medios de Cultivo

Para estudiar la acción inhibitoria del sorbato de potasio, se aisla

ron microorganismos de la flora natural de la carne y se sembraron sobre PCA al cual se le había agregado distintas concentraciones del preservador (entre 0.025% y 0.4%). Los microorganismos sembrados se obtuvieron de las suspensiones de las muestras control de 3 músculos de pH: 5.80. El pH del medio de cultivo se ajustó a tres niveles 5.60, 5.90 y 6.10.

Los recuentos obtenidos expresados como log UFC/ml en función del tiempo se muestran en las Fig. 23a, b y c (Apéndice 4 Tabla XI a, b y c). A partir de estas figuras se determinaron los tiempos t_{control} y $t_{\text{trat.}}$ definido en 5.3.1 y se calcularon los índices de inhibición (I); éstos últimos se presentan en la Tabla 24, los cuales dependen del pH del medio y de la concentración de sorbato de potasio.

Tabla 24: Índices de inhibición (I) en función de la concentración de sorbato de potasio y pH del medio de cultivo

Concentración de sorbato de potasio (%)	Concentración de sorbato de potasio expresado como ácido sórbico (mM)	Índice de inhibición (I)		
		pH 5.60	pH 5.90	pH 6.10
0.025	2.23	0.12	0.08	-
0.05	4.46	0.20	0.16	0.12
0.10	8.93	0.33	0.25	0.20
0.20	17.86	0.57	0.38	0.30
0.30	26.79	--	0.52	0.42
0.40	35.71	--	--	0.52

En la Fig. 24 se graficaron dichos índices vs. la concentración de ácido sórbico expresada en milimoles por litro de medio de cultivo. De esta figura se obtuvieron las concentraciones de ácido que provocaban un $I = 0.5$ (m.c.i.). Las m.c.i. son función del pH del medio o lo que es equivalente

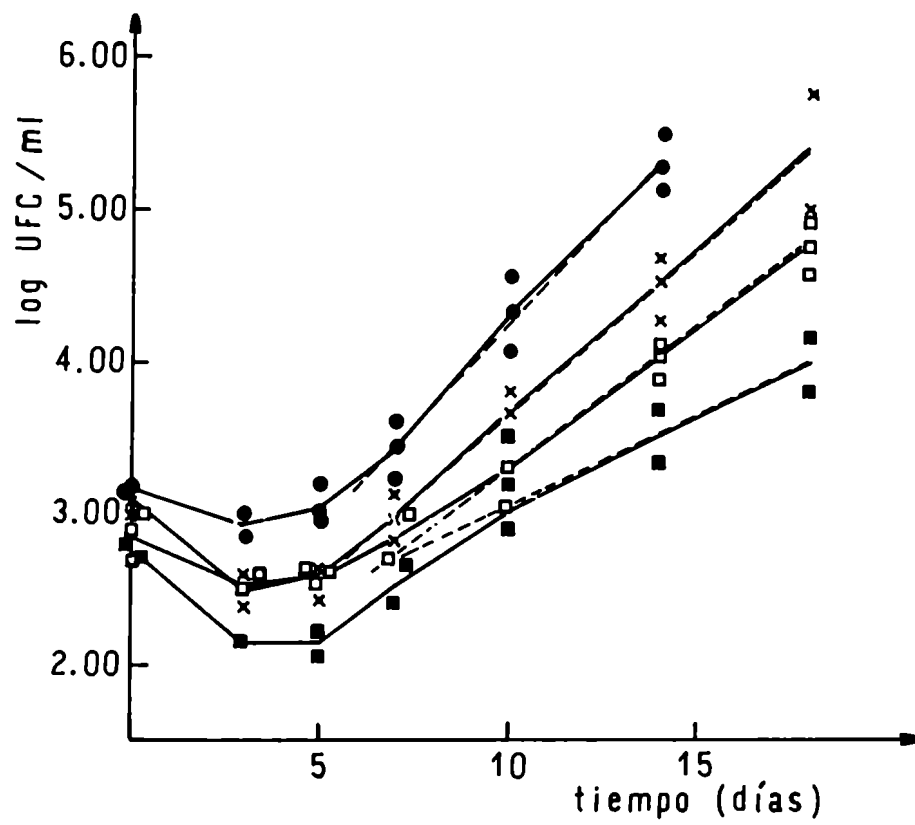


Fig. 23 a

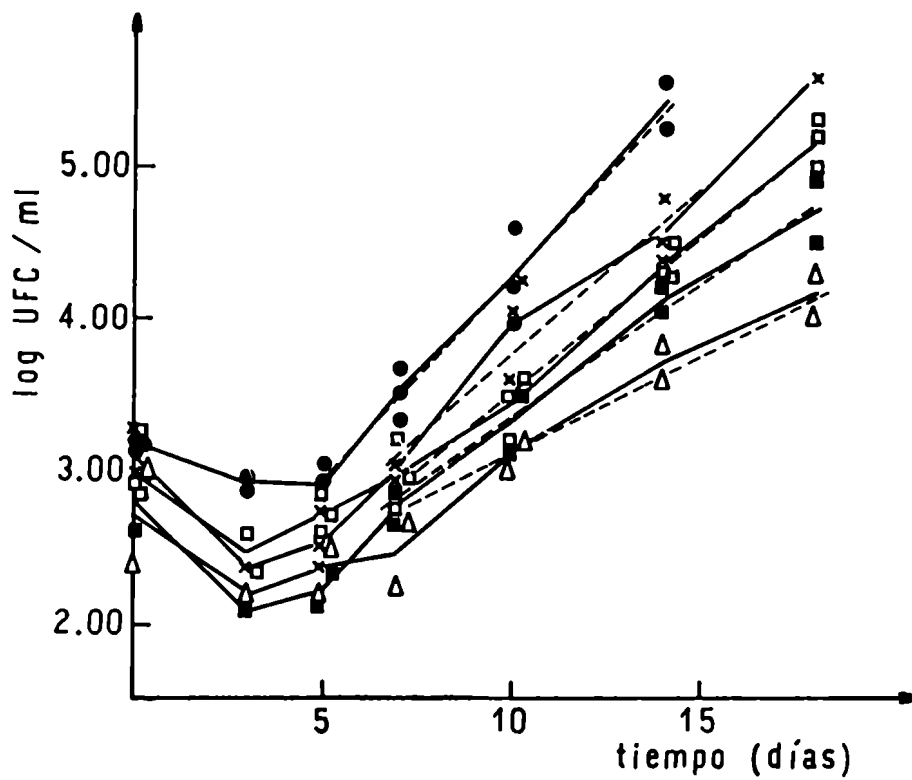


Fig. 23 b

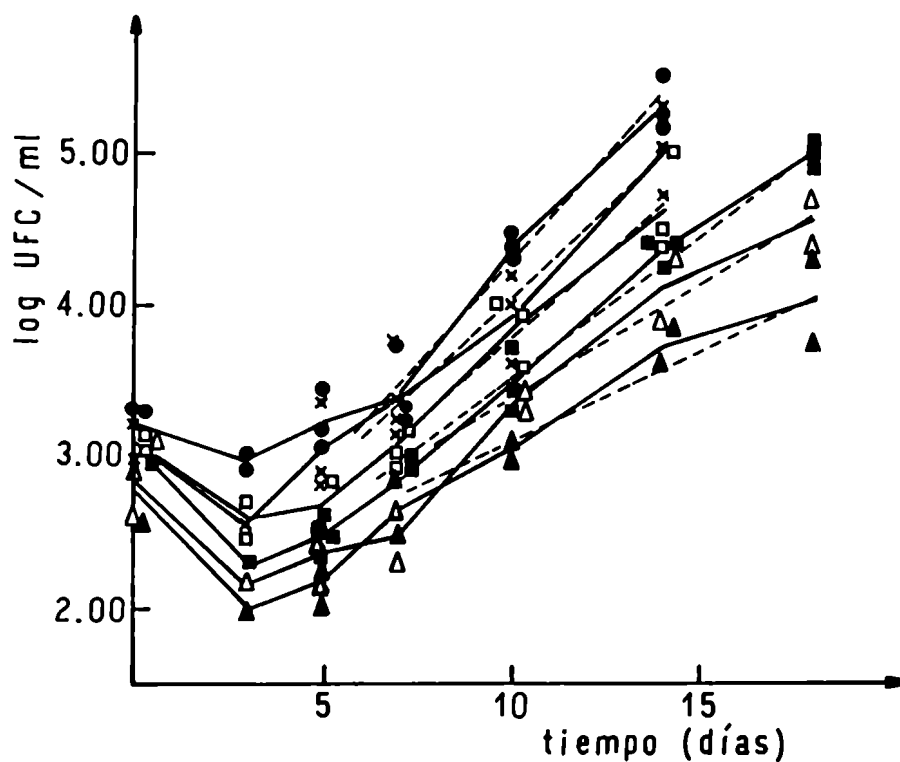


Fig. 23c .

Fig. 23: Efecto de la concentración de sorbato de potasio y pH del medio de cultivo sobre el crecimiento microbiano.

Concentraciones de sorbato (%) :

—●— control

—x— 0.05

—□— 0.10

—■— 0.20

—△— 0.30

—▲— 0.40 .

pH del medio de cultivo: a) 5.60 b) 5.90 c) 6.10

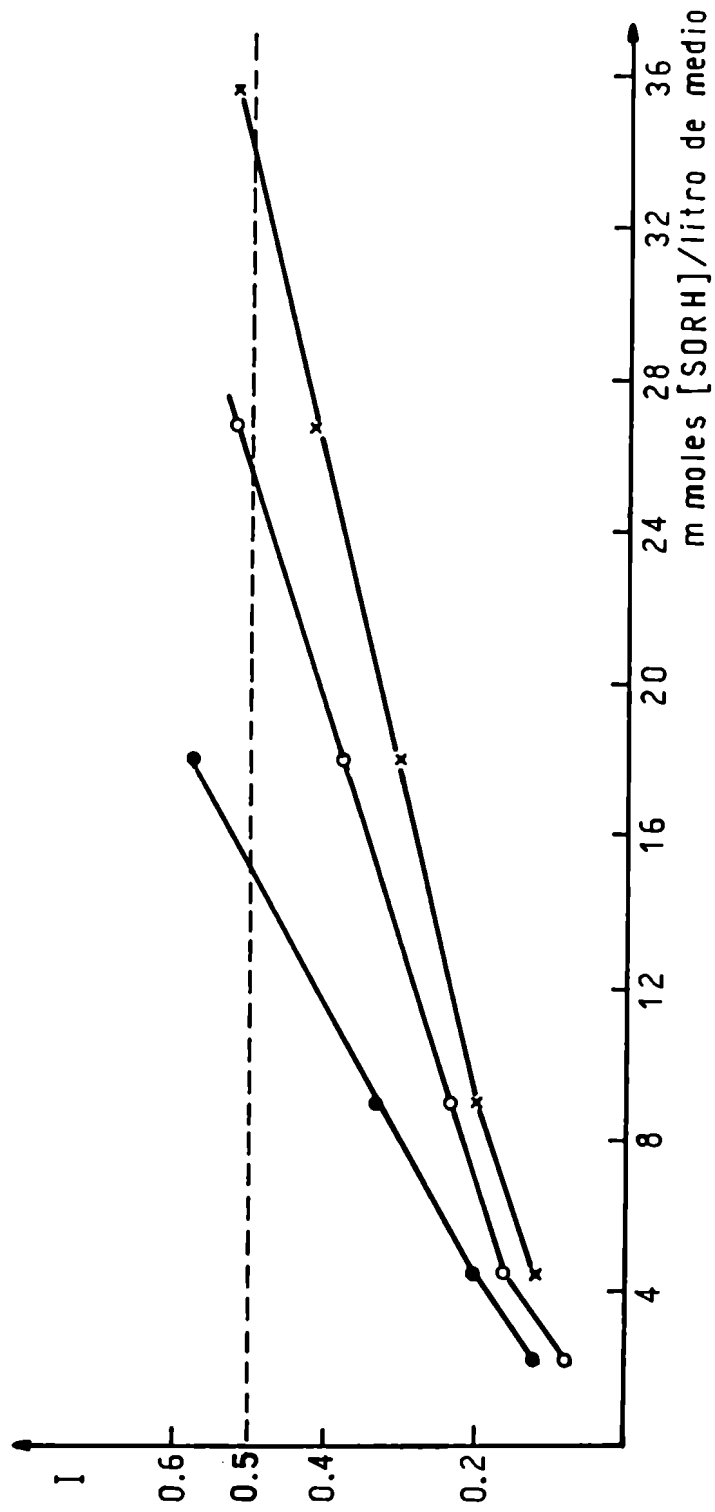


Fig. 24: Variación del Índice de Inhibición con la concentración de ácido sórbico del medio de cultivo. pH del medio: ●- 5.60 ○- 5.90 ×- 6.10.

a valores de f de acuerdo a la Ec. (24) y las mismas se presentan en la Tabla 25.

Tabla 25: Mínima concentración inhibitoria de ácido sórbico en medios de cultivo

pH	f	m.c.i. (mM)	m.c.i. (ppm)	(m.c.i.) Ec. (26) (ppm) $n. dis$
5.60	0.1263	15.0	1680	212.2
5.90	0.0675	25.2	2822	190.6
6.10	0.0437	34.0	3808	166.4

Para obtener valores de concentraciones de ácido sórbico que produzcan inhibición total se aumentó el nivel de sorbato en el medio de cultivo hasta el 0.6% sembrando en los mismos Lactobacillus sp.. No se registró crecimiento en las placas de pH = 5.60 y 0.6% de sorbato, lo que equivale a 556 ppm de ácido sórbico no dissociado. En las placas de pH 5.90 y 6.10 con la concentración de sorbato mencionada se observó crecimiento, aunque éste fue escaso.

De acuerdo con Lueck (1980) la m.c.i. de ácido sórbico no dissociado que provoca una inhibición del 100%, en un rango de pH entre 4.3 y 6.0, para el caso de especies de Lactobacillus es de 200 a 700 ppm. Por lo tanto los valores hallados en el presente trabajo son del orden de los reportados en literatura.

La aplicación del modelo de Eklund (Ec. (38)) a los datos de m.c.i. obtenidos en medios de cultivos arrojó los valores de las constantes que se indican en la Tabla 26.

Tabla 26: Determinación de las constantes del modelo Eklund, aplicado a las m.c.i. obtenidas en medios de cultivo

k_{dis} (mM)	σ_{kdis} (mM)	k_{ndis} (mM)	$\sigma_{k_{n.dis}}$ (mM)	$k_{dis}/k_{n.dis}$	pH_{50}
67.97	4.38	1.48	0.02	45.83	6.42

Dichas constantes fueron calculadas aplicando un programa de ajuste de parámetros para regresiones no lineales (Marquardt).

La fracción $k_{dis}/k_{n.dis}$ indica cuanto más ácido disociado respecto del no disociado se requiere para lograr una determinada inhibición. La alta relación encontrada señala la posibilidad de que el modelo tradicional, basado en la acción antimicrobiana del ácido no disociado, ajuste satisfactoriamente los datos experimentales.

El valor del pH_{50} indica el nivel de pH por arriba del cual más del 50% de la actividad inhibitoria es debida a la fracción disociada. El cálculo del mismo se realiza igualando la contribución de ambas fracciones en Ec. (28).

$$\frac{SOR^{-} \text{ m.c.i.}}{SORH \text{ m.c.i.}} = \frac{k_{dis}}{k_{no \text{ dis}}} \quad (39)$$

Reemplazando la relación de concentraciones en la Ec. (21) resulta:

$$pH_{50} = \log \frac{k_{dis}}{k_{n.dis}} + pK \quad (40)$$

Los resultados obtenidos señalan que la fracción disociada comienza a ser efectiva a $pH = 6.40$

Si se acepta la validez del modelo tradicional, de acuerdo con la

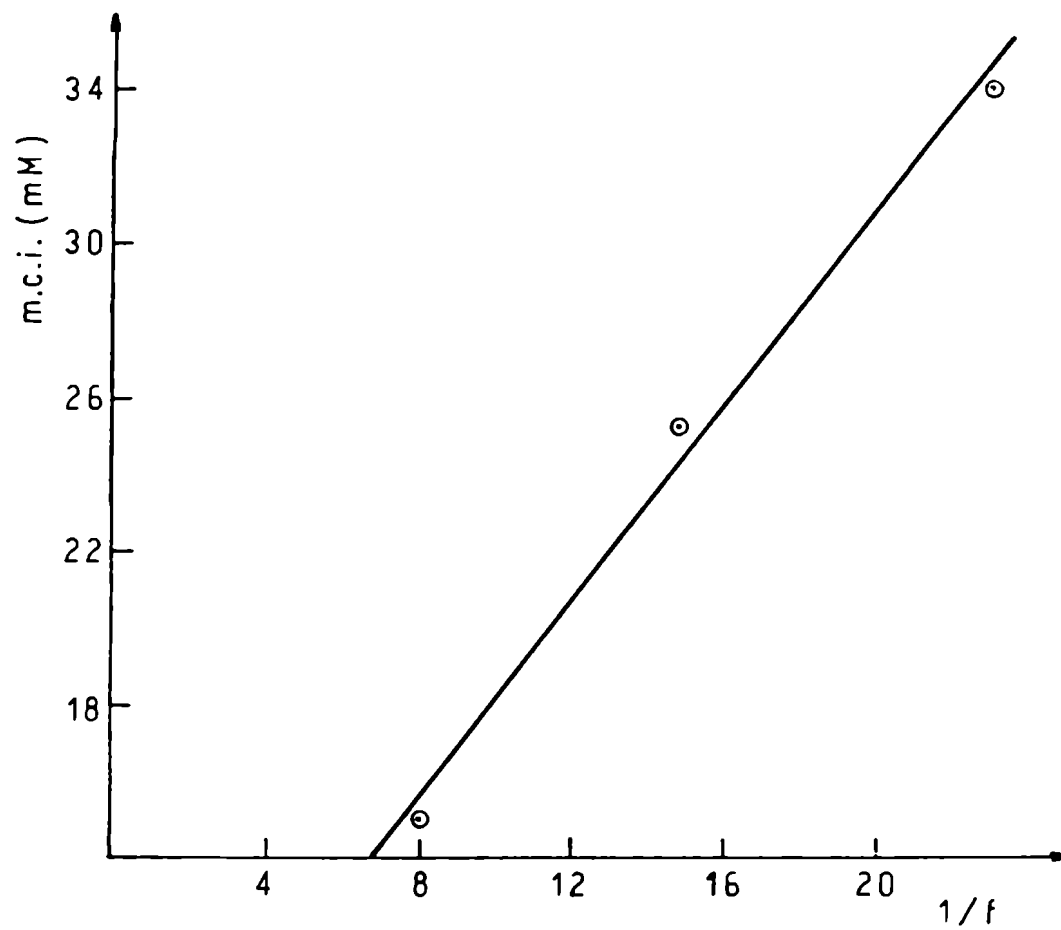


Fig. 25: Variación de la m.c.i. en medios de cultivo en función de $1/f$ (Modelo Tradicional).

Ec. (26), la representación de la m.c.i. en función de $1/f$ debería conducir a una recta de pendiente $(m.c.i.)_{n,dis}$, lo que se verifica en la Fig. 25.

5.3.4 Determinación del Índice de Inhibición y de la Mínima Concentración Inhibitoria en Carnes Bovinas

5.3.4.1 Dosaje de Sorbato de Potasio en Carne

La Fig. 26 representa la curva de calibración utilizada en el método espectrofotométrico de dosaje del ácido sórbico, donde A es la absorbancia medida a una longitud de onda de 250 nm.

Mediciones del contenido de ácido sórbico en carne refrigerada no mostraron variaciones en la concentración del preservador durante el período de almacenamiento.

Los ensayos realizados en carne cocida arrojaron resultados similares a los obtenidos en crudo, no existiendo, por lo tanto, una disminución del nivel de sorbato por el proceso de cocción.

En la Tabla 27 figuran los valores de residuo de sorbato de potasio expresados como ppm de ácido sórbico, dosados en rodajas de carne para distintas concentraciones en la solución aplicada; dichos valores disminuyen notoriamente cuando se trabaja con músculos enteros. Así por ejemplo, la relación área/volumen de una rodaja (1.75) con respecto a la del músculo semitendinoso entero (0.5) es de 3.5, indicando que el área rociada y por ende el residuo desciende cuando se considera el músculo entero.

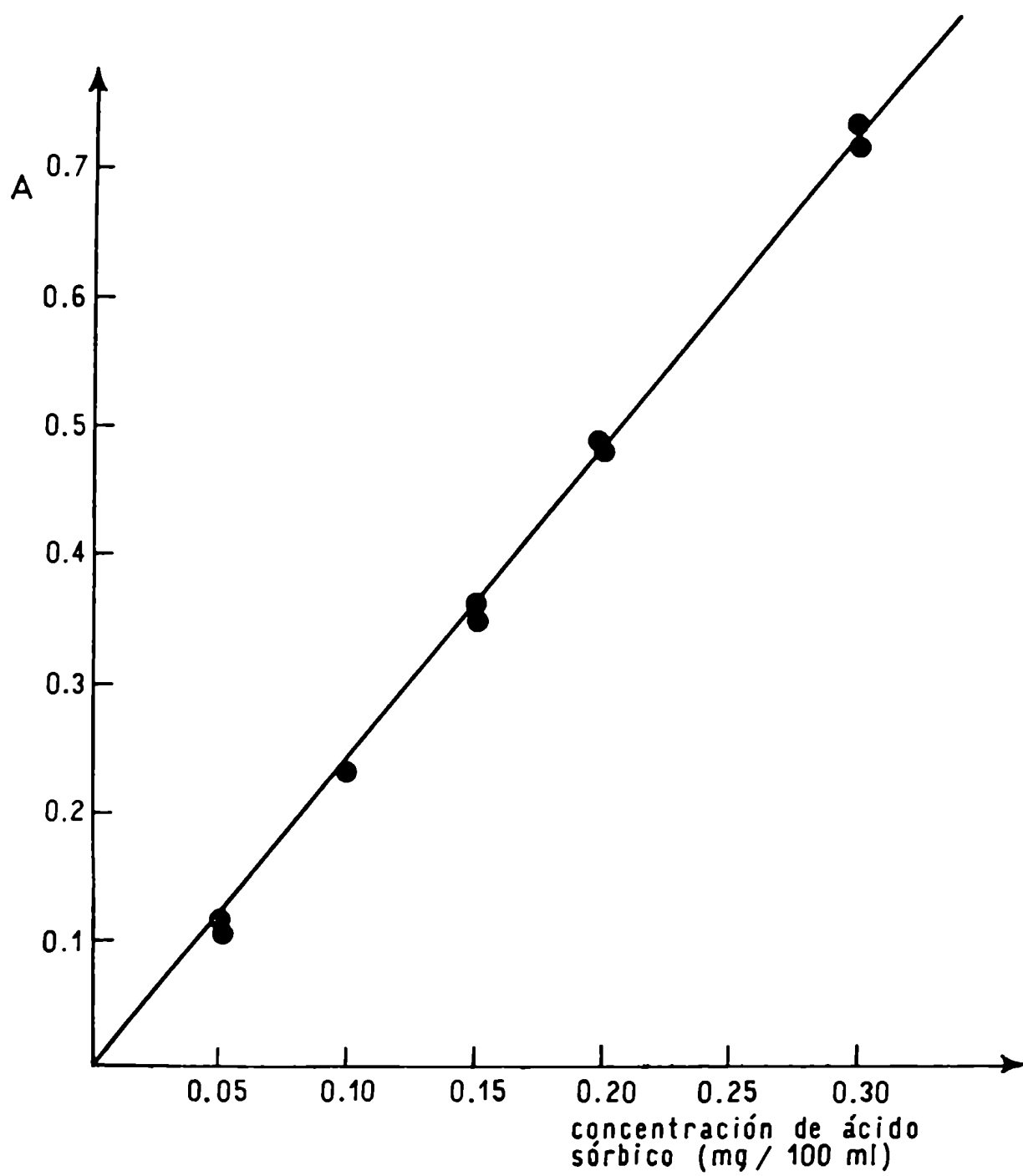


Fig. 26: Curva de calibración del ácido sórbico.

A = absorbancia a 250 nm .

Tabla 27: Residuo de sorbato de potasio en carne

(Expresado como ácido sórbico)

Concentración de Sorbato de Potasio en Solución (%)	Residuo en Carne (ppm)
4	530
3	400
0.76	100
0.43	60
0.21	27

5.3.4.2 Aplicación de los Modelos de Acción Inhibitoria del Acido Sórbico
a Carnes Bovinas

A partir de la información de las Fig. 16 a, b, c, d y e, se determinaron los tiempos t_{control} y $t_{\text{trat.}}$ para cada una de las concentraciones de sorbato de potasio y pH de la carne empleados. Los resultados obtenidos de los cálculos del índice de inhibición se presentan en la Tabla 28 .

En la Fig. 27 se graficaron los Indices en función de la concentración de ácido sórbico expresada en milimoles por Kg de tejido y de determinaron los valores de m.c.i. (de igual forma que en 5.3.3), los cuales se indican en la Tabla 29.

Aplicando el modelo de Eklund a los datos de m.c.i. obtenidos en carne se llegó a los valores de las constantes que figuran en la Tabla 30.

Comparando los resultados de la Tabla 30 con los obtenidos en medios de cultivo (Tabla 26), se puede observar que si bien los valores de las constantes difieren, la relación $k_{\text{dis}}/k_{\text{n.dis}}$ y el pH_{50} son muy similares.

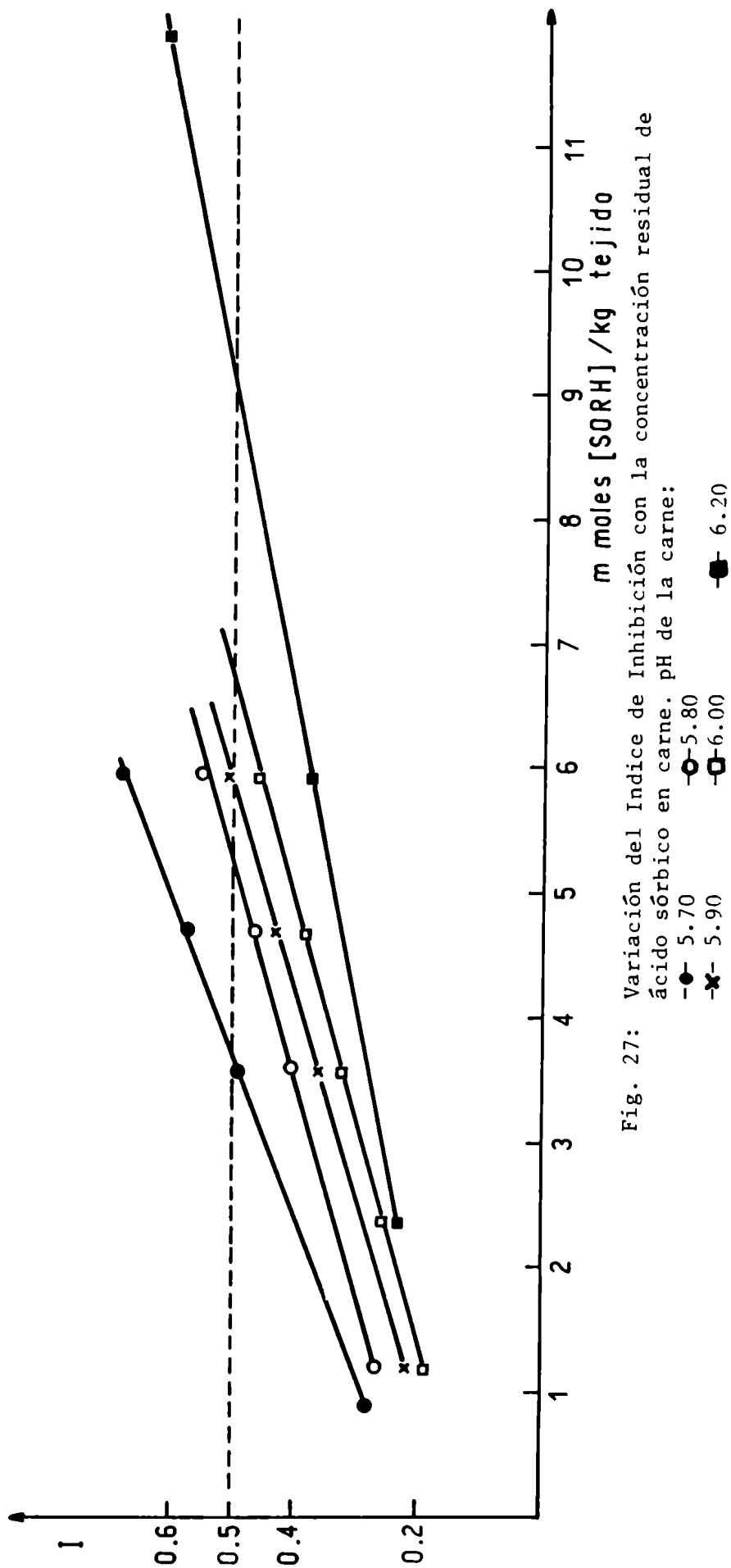


Fig. 27: Variación del Índice de Inhibición con la concentración residual de ácido sórbico en carne. pH de la carne:

-●- 5.70 -○- 5.80 -x- 5.90 -□- 6.00 -■- 6.20

Tabla 28: Indices de inhibición (I) en función de la concentración de sorbato de potasio y pH de la carne

Concentración de sorbato de potasio en la solución de rociado (%)	Concentración residual de sorbato de potasio en carne, expresada como ácido sórbico (m moles/kg tejido)	Indice de inhibición (I)				
		pH				
		5.70	5.80	5.90	6.00	6.20
0.76	0.90	0.28	0.19	0.14	--	--
1.00	1.20	--	0.27	0.21	0.19	--
2.00	2.40	--	--	--	0.26	0.23
3.00	3.60	0.49	0.40	0.36	0.32	--
4.00	4.73	0.57	0.46	0.43	0.38	0.32
5.00	5.96	0.68	0.55	0.51	0.46	0.38
10.00	11.90	--	--	--	--	0.61

Tabla 29: Mínima concentración inhibitoria de ácido sórbico en carne bovina

pH	f	m.c.i. (m moles/kg tejido)	m.c.i. (ppm)
5.70	0.1030	3.75	420
5.80	0.0836	5.20	582
5.90	0.0675	5.90	661
6.00	0.0544	6.70	750
6.20	0.0350	9.00	1008

Tabla 30: Determinación de las constantes del modelo de Eklund aplicado a las m.c.i. obtenidas en carne

k_{dis} (m moles/kg)	$\sigma_{k_{dis}}$	$k_{n.dis}$ (m moles/kg)	$\sigma_{k_{n.dis}}$	$k_{dis}/k_{n.dis}$	pH ₅₀
23.09	4.39	0.51	0.04	45.30	6.42

La carne se comporta como un sistema buffer, variando su pH entre 5.60 y 6.20, aproximadamente. Además, como se mencionó en la sección 3.4.1, los músculos con pH superior a 5.90 se deterioran más rápidamente y por lo tanto no es aconsejable envasarlos al vacío.

Tomando en consideración el estrecho rango de pH de la carne bovina apta para almacenar (5.60 - 5.90) y el valor de pH_{50} obtenido (6.42), se puede inferir que el aporte inhibitorio de la parte disociada del ácido sórbico es despreciable para el caso estudiado. Adoptándose, en consecuencia, el modelo tradicional. La representación del mismo se presenta en la Fig. 28, pudiendo observarse un buen ajuste de dicho modelo a los datos obtenidos.

5.4 Modelo de Crecimiento Microbiano en Carnes Conservadas con Sorbato de Potasio

Un modelo de crecimiento microbiano similar al presentado en la sección 3.5 (Ec. (1)), puede ser planteado en el caso de utilizar soluciones preservadoras de sorbato de potasio para extender la vida útil de la carne bovina:

$$N = N_0 e^{\mu'(t - \theta')} \quad (41)$$

Los parámetros μ' (velocidad de crecimiento) y θ' (fase de latencia) son función de la concentración de la solución de sorbato de potasio (C_{SorK}) empleada y del pH de la carne

$$\mu' = f(C_{\text{SorK}}; \text{pH de la carne})$$

$$\theta' = f(C_{\text{SorK}}; \text{pH de la carne})$$

Estas dos variables independientes se pueden reducir a una sola, que es la concentración de ácido sórbico no disociado (como ya se comprobó a través de la aplicación del modelo tradicional).

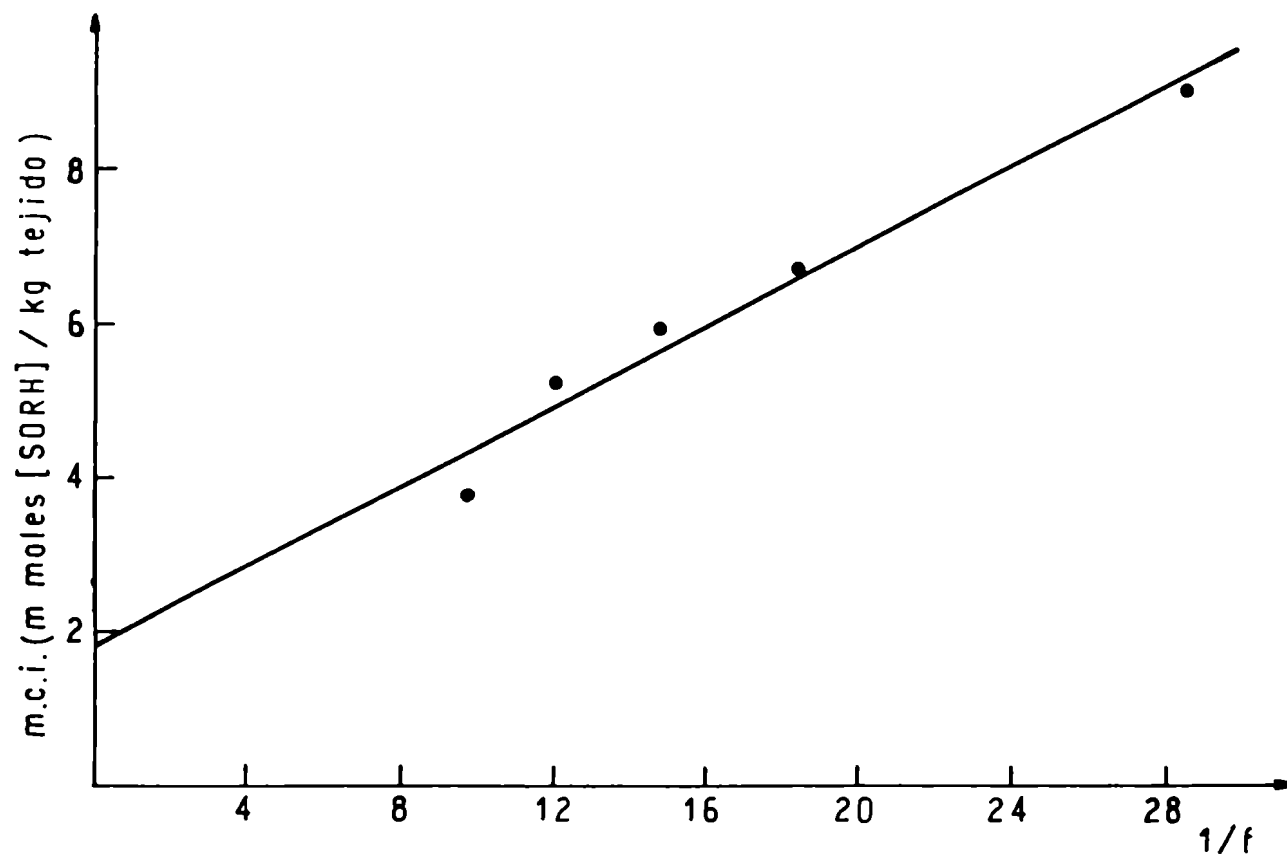


Fig. 28: Variación de la m.c.i. en carne en función de $1/f$
(Modelo Tradicional).

5.4.1 Determinación de los Parámetros μ' y θ' en función de la Concentración de Acido Sórbito no Disociado

Los valores de fase de latencia y velocidad de crecimiento obtenidos para los recuentos de microorganismos totales a 4°C, en películas de baja permeabilidad (Fig. 16 a, b, c, d y e, Apéndice 4 Tablas IV a, b, c, d y e), se representaron (Fig. 29 y 30) en función de la concentración de ácido sórbito no disociado (expresado en m moles/kg de tejido). Los datos se regresionaron hallándose las siguientes ecuaciones:

$$\theta' = \theta + k_{\theta}' [\text{SORH}]_{n.\text{dis}} \quad (\text{días}) \quad (42)$$

$$\mu' = \mu - k_{\mu}' [\text{SORH}]_{n.\text{dis}} \quad (1/\text{días}) \quad (43)$$

donde θ y μ indican la fase de latencia y velocidad de crecimiento de los microorganismos correspondiente al caso de no emplear preservador.

$$\theta = 3.40 \pm 0.92 \text{ (días)} \quad k_{\theta}' = 18.49 \pm 3.26 \left(\text{días} / \frac{\text{m moles } [\text{SORH}]_{n.\text{dis}}}{\text{kg tejido}} \right)$$

$$\mu = 0.667 \pm 0.023 \text{ (días)}^{-1} \quad k_{\mu}' = 0.368 \pm 0.085 \left(\text{días} \cdot \frac{\text{m moles } [\text{SORH}]_{n.\text{dis}}}{\text{kg tejido}} \right)^{-1}$$

El intervalo de confianza de cada parámetro fue calculado para un nivel de significación del 95 % (Apéndice 3 a).

Construyendo gráficos similares para los recuentos individuales de cada género microbiano se llega a expresiones lineales equivalentes, cuyas respectivas constantes se muestran en la Tabla 31.

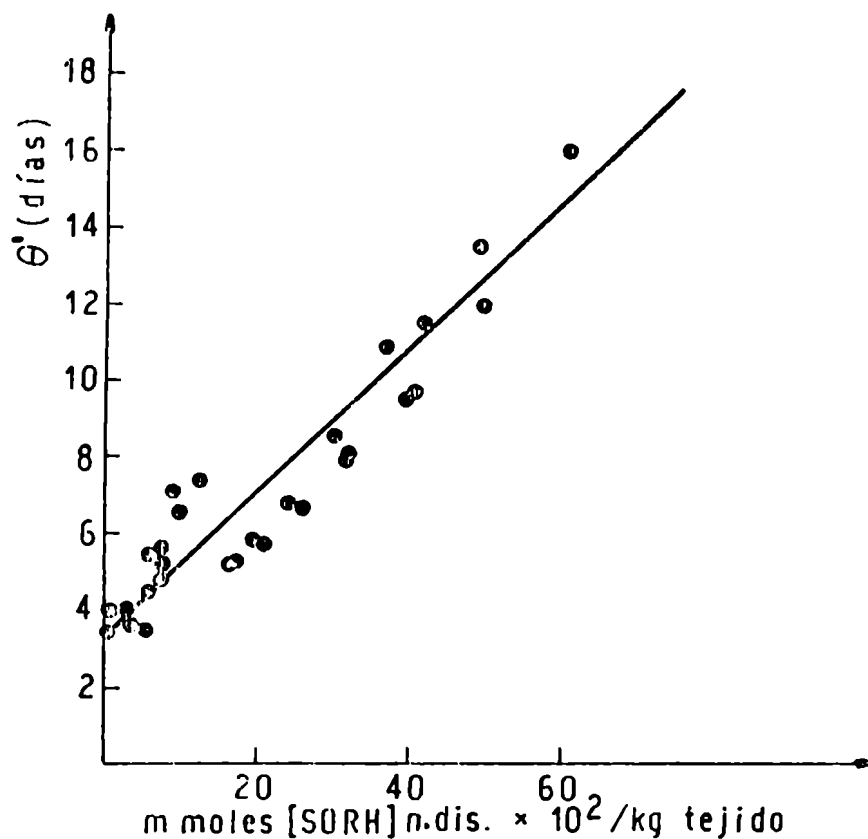


Fig. 29: Variación de la fase de latencia, correspondiente a los microorganismos totales, con la concentración de ácido sórbico no disociado.

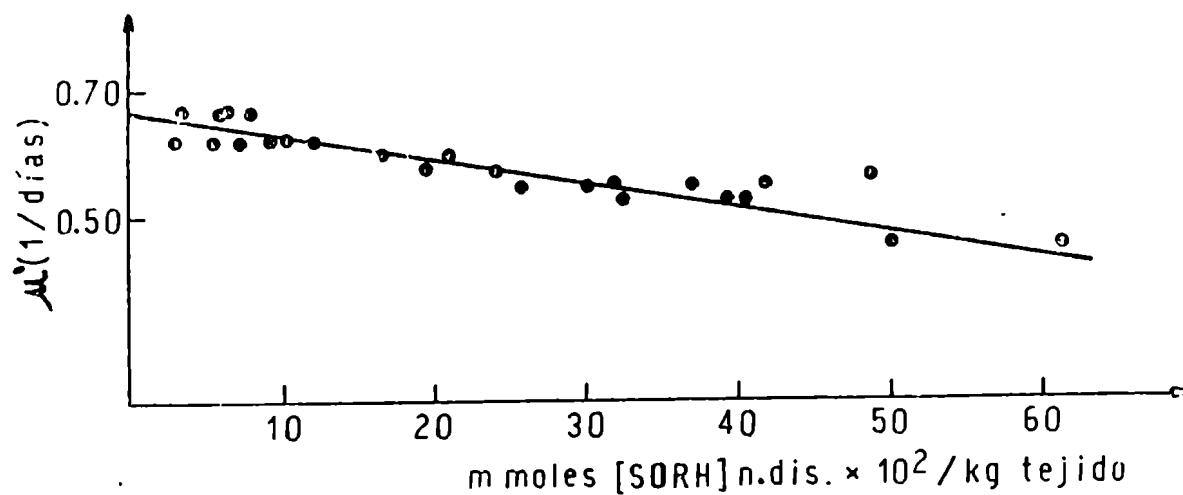


Fig. 30: Variación de la velocidad de crecimiento, correspondiente a los microorganismos totales, con la concentración de ácido sórbico no disociado.

Tabla 31: Valores de la constantes correspondientes a la determinación de θ' y μ' de cada uno de los componentes de la flora microbiana

Microorganismos	θ_i (días)	$k_{\theta_i}^*$	μ_i (días) ⁻¹	$k_{\mu_i}^{**}$
<u>Lactobacillus</u> sp.	4.51 ± 0.50	13.30±2.23	0.736±0.025	0.414±0.091
<u>Pseudomonas</u> sp.	6.23 ± 0.08	20.60±0.35	0.506±0.020	0.345±0.081
<u>B. thermosphacta</u>	4.57 ± 0.68	18.05±2.35	0.460±0.040	0.713±0.057
<u>Enterobacteriaceae</u>	2.12 ± 0.26	12.90±2.15	0.621±0.033	0.506±0.106
Levaduras	3.34 ± 0.65	18.10±2.81	0.327±0.019	0.117±0.023

(*) (días/ $\frac{m \text{ moles } [SORH]_{n.dis}}{\text{kg tejido}}$)

El intervalo de confianza de cada parámetro fue calculado para un nivel de significación del 95%.

(**) (días, $\frac{m \text{ moles } [SORH]_{n.dis}}{\text{kg tejido}}$)⁻¹

5.4.2 Estimación del Número de Microorganismos

Con el objeto de predecir el número de microorganismos en función del tiempo de almacenamiento, para distintas concentraciones de sorbato de potasio, se utilizó la siguiente expresión:

$$N = \sum_{i=1}^n N_{oi} e^{\mu'_i (t - \theta'_i)} \quad (44)$$

válida para $t \leq t_{e_i}$

donde

$i = 1, \dots, n$, componentes de la población microbiana

t_{e_i} = tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria

$$\theta'_i = \theta_i + k_{\theta_i}^* [SORH]_{n.dis}$$

$$\mu'_i = \mu_i - k_{\mu_i}^{**} [SORH]_{n.dis}$$

La Fig. 31 muestra la representación de los log N predichos por la Ec. (44), utilizando las constantes de la Tabla 31, y de los datos experimentales de log N correspondientes a los recuentos totales. Estos últimos fueron obtenidos a partir de muestras de carne de distinto pH, tratadas con soluciones de sorbato de potasio entre 0.21% y 10%, para un tiempo de almacenamiento de 20 días en películas de baja permeabilidad a 4°C.

El apartamiento de la recta de 45° es un índice de la desviación del modelo, la cual fue calculada utilizando la siguiente expresión:

$$\text{desvío porcentual} = \sqrt{\frac{\sum \left(\frac{\log N_{\text{pred.}} - \log N_{\text{exp}}}{\log N_{\text{exp}}} \right)^2}{N - 1}} \times 100 \quad (45)$$

siendo este desvío del 4.91%.

El satisfactorio ajuste de las ecuaciones a los datos experimentales señala la factibilidad del empleo de modelos matemáticos para predecir el crecimiento microbiano en carnes tratadas con sorbato de potasio y envasadas en películas plásticas de baja permeabilidad al oxígeno.

5.4.3 Determinación de los Niveles de Sorbato de Potasio que Duplican el t_{10^7}

A partir de datos experimentales y del modelo planteado se determinaron las concentraciones de sorbato de potasio que conducen a la duplicación del tiempo que tardan los microorganismos en alcanzar recuentos de 10^7 UFC/cm² (t_{10^7}), respecto de las muestras no tratadas (Tabla 32).

Como se desprende de la tabla, tanto a 0°C como a 4°C los niveles residuales no superan las 1000 ppm de preservador.

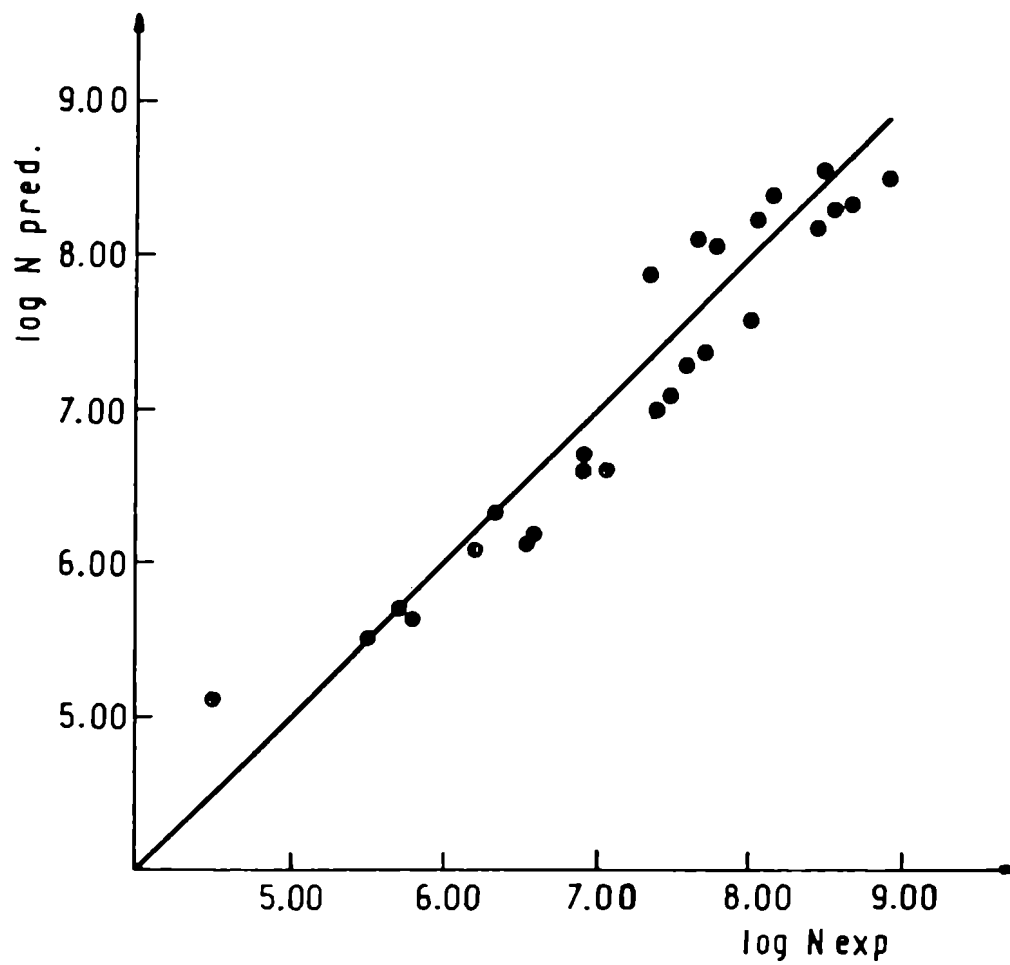


Fig. 31: Desvío del logN pred. respecto del logN exp.
alrededor de la recta de 45°.

Tabla 32: Concentraciones de sorbato de potasio para duplicar el t_{10}^7 en carnes envasadas en EVA-SARAN-EVA

Temperatura de almacenamiento	pH de la carne	Concentración de sorbato de potasio en la solución de rociado (%)	Residuo de ácido sórbico en carne (ppm)
0	5.90	4.0	530
4	5.90	7.0	928
4	5.70	4.4	582

5.5 Análisis de la Aplicabilidad del Sorbato de Potasio en Carne

Los trabajos realizados con sorbato, por otros autores, fueron aplicados a pollo o carnes curadas utilizando generalmente soluciones de sorbato al 5 y 10%. Cunningham (1979) determinó, a través de evaluaciones sensoriales, que cuando se trataba pollo con soluciones de sorbato al 5 y 10% no se producían cambios organolépticos en el mismo, pero si se usaba una solución al 15% ya eran detectados sabores extraños.

Robach (1979) estudió la efectividad del sorbato de potasio en pollo, encontrando que el empleo de una solución al 5% a través de una inmersión de 30 segundos (lo que deja un residuo de 1200 a 1300 ppm de ácido sórbico) extiende la vida útil del producto a 3°C desde 10 días (control) a 19 días.

Robach y col. (1980) determinaron que la adición de 1200 ppm de ácido sórbico a pavos cocidos prolonga el tiempo para alcanzar recuentos de 10^7 , a 4°C, desde 15 días (control) hasta 42 días para el producto tratado.

Leistner (1982) utilizó una solución compuesta por sorbato de potasio 20%, acetato de sodio 5% y cloruro de sodio 5% para tratar carne bovina, no

refrigerada, destinada a países africanos; de esta manera se logró extender la vida útil de la carne a temperaturas elevadas.

El Código Alimentario Argentino aún no ha contemplado la aplicación del sorbato de potasio a carnes frescas, si bien ya está permitido en otros alimentos.

El ácido sórbico está considerado una sustancia no tóxica, dado que en el organismo se metaboliza como los ácidos grasos, es decir a dióxido de carbono y agua.

La Ingesta Diaria Admisible (IDA) es la cantidad de un aditivo, agregado a un alimento, que puede ingerir un hombre diariamente, en la dieta, durante toda la vida, sin riesgo.

En el caso del ácido sórbico la Ingesta Diaria Admisible (IDA) = 25 mg/kg de peso (FAO/OMS, 1973).

Para una persona de 70 kg la IDA = 1750 mg de sórbico y para una de 10 kg es de 250 mg.

Considerando el consumo de carne por habitante y por año en los países compradores de carnes argentinas (Tabla 33), que son fundamentalmente la CEE, ALADI y la Unión Soviética, se obtiene un promedio de 26.4 kg/hab. año; lo que equivale a aproximadamente un consumo diario de 73 g/hab.

Tabla 33: Consumo de carne (kg/hab. año)

Países	1981	1982	1983
Francia	31.7	30,6	30.8
Unión Soviética	26.2	26.0	26.1
Colombia	26.1	24.6	22,7
Italia	25.6	25.9	25.6
Venezuela	24.0	22.7	21.1
Reino Unido	23.3	21.2	21.4
R.F. de Alemania	23.0	21.9	21.4

Fuente: Junta Nacional de Carnes (Agosto 1984)

Si se tiene en cuenta el residuo que deja una solución de sorbato de potasio al 7% (928 mg/kg carne), se alcanza una ingesta diaria promedio de 67.7 mg de sórbico. Esto demuestra que los valores indicados en la sección 5.4.3 se hallan muy por debajo de los niveles admitidos, aún habiendo sido obtenidos para secciones de músculos como se señaló en 5.3.4.1.

Evalando la relación riesgo/beneficio con respecto al empleo del sorbato de potasio en carne bovina se puede concluir que, los riesgos, dentro de los niveles recomendados en este trabajo, serían mínimos pues la cantidad que llegaría a ingerirse es pequeña.

Considerando el precio de exportación de los cortes refrigerados (3340 dólares/tonelada; J.N.C., 1982) y la cantidad necesaria de preservador tomando como base un músculo semitendinoso (sección 2.9.1) y una solución al 7%, la incidencia del costo del sorbato sobre el de la carne es de 0.81%, aproximadamente.

Los beneficios serían la obtención de un producto de óptima calidad con una vida útil más prolongada, lo que posibilitaría la comercialización durante períodos más extensos.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- 1 . Bajo condiciones aeróbicas de almacenamiento de carne bovina, las especies de Pseudomonas muestran una marcada ventaja en la velocidad de crecimiento comparadas con otros géneros y esa ventaja tiende a incrementarse con el descenso de la temperatura. Los niveles máximos que alcanzan estos microorganismos se hallan entre 10^8 y 10^9 UFC/cm², siendo el oxígeno, aparentemente, el factor limitante del crecimiento. El deterioro se detecta cuando los recuentos de esas bacterias superan los 10^7 UFC/cm² debido probablemente al agotamiento de la glucosa en la superficie de la carne, utilizando en su defecto aminoácidos. La presencia de anaerobios facultativos no afecta la velocidad de crecimiento de las aerobias, presumiblemente porque no reducen suficientemente el nivel de oxígeno como para limitar el desarrollo de pseudomonas.
- 2 . El deterioro de la carne almacenada anaeróbicamente se desarrolla lentamente después que los microorganismos han alcanzado la máxima densidad celular; por lo tanto, los recuentos no tienen el mismo significado como medida del deterioro que la atribuida bajo condiciones aeróbicas, prolongándose los períodos de almacenamiento luego que las bacterias superan los valores de 10^7 UFC/cm², sin que la carne muestre signos de alteración. En vacío, el sustrato limitante es la glucosa existiendo competencia entre los microorganismos por la disponibilidad de la misma. B. thermosphacta tiene mayor afinidad por la glucosa que Lactobacillus sp., no pudiendo explicar por este medio el predominio de los lactobacilos; estos últimos inhiben el desarrollo de otros organismos por la producción de un agente antimicrobiano, posiblemente un antibiótico.
- 3 . El crecimiento microbiano en carne bovina refrigerada y envasada en función

del tiempo de almacenamiento se interpretó a través de un modelo matemático, que posibilita el cálculo del número de microorganismos por medio de los parámetros velocidad de crecimiento y fase de latencia, de cada uno de los integrantes de la flora. La ecuación propuesta y los parámetros medidos permiten una satisfactoria estimación de la contaminación, en condiciones de almacenamiento que son muy comunes en la industria cárnica.

- 4 . La demanda bacteriana de oxígeno comienza a ser importante cuando la población microbiana es superior a 10^8 /g. En carne envasada al vacío, la demanda es aún menor pues la flora está dominada por especies de Lactobacillus que son microaerófilas, y, por lo tanto, sus requerimientos de oxígeno mínimos.
- 5 . Las modificaciones de la atmósfera gaseosa del interior de los envases al vacío se interpretaron a través de balances de materia para cada uno de los gases en estudio (O_2 , CO_2 y N_2). Comparando los valores teóricos (calculados a través de los balances) con los experimentales (medidos cromatográficamente) se obtuvo una satisfactoria coincidencia entre ambos resultados, lo cual implica una correcta estimación de los parámetros intervinientes en las ecuaciones.
- 6 . La extensión de la vida útil de la carne por la utilización de soluciones de sorbato de potasio, se puso de manifiesto a través de la disminución de la velocidad de crecimiento y del aumento de la fase de latencia de los distintos microorganismos. La mayor inhibición se obtiene sobre B. thermosphacta, en donde además se ven disminuídos los niveles finales alcanzados.

Al final del almacenamiento Lactobacillus sp. (en EVA-SARAN-EVA) y Pseudomonas sp. (en polietileno) siguen siendo las bacterias predominantes.

- 7 . Cuando se utilizan películas permeables al oxígeno no se justifica el empleo de preservadores, pues el color se deteriora antes que la población microbiana alcance recuentos de 10^7 UFC/cm². En cambio, con películas de baja permeabilidad, el color permanece inalterable, aún después que los recuentos lleguen al nivel mencionado.
- 8 . El poder inhibidor del sorbato de potasio es mayor cuanto menor es el pH de la carne. Los tiempos necesarios para alcanzar recuentos de 10^7 UFC/cm² (t_{10^7}), en el caso de emplear una solución al 5% (EVA-SARAN-EVA, 4°C), se extienden 2.3 veces a pH = 5.70, 1.9 veces a pH = 5.80 y 1.6 veces a pH = 5.90, respecto de las muestras no tratadas.
- 9 . La efectividad del preservador se acentúa al disminuir la temperatura. La duplicación del t_{10^7} , respecto del control en el caso de utilizar envases de baja permeabilidad, se logra con una solución preservadora al 7% a 4°C y con una solución al 4% a 0°C, para un pH de la carne 5.90.
- 10 . Se ha asumido, comúnmente, que el ácido sórbico y otros ácidos débiles muestran actividad antimicrobiana solamente en el estado no dissociado. Sin embargo, otros modelos proponen un cierto aporte de la forma dissociada. Para el caso de la carne bovina ese aporte se puede considerar despreciable, pues recién sería efectivo a partir de pH = 6.40, mientras los músculos aptos

para almacenar deben tener un valor de pH menor o igual que 5.90.

- 11 . El crecimiento microbiano en carnes conservadas con sorbato de potasio y envasadas en películas de baja permeabilidad a gases, también fue modelado a través de ecuaciones matemáticas similares a las descriptas en músculos no tratados. Los parámetros velocidad de crecimiento y fase de latencia resultan funciones de la concentración de la solución preservadora y del pH de la carne. Estas dos variables independientes se pueden reducir a una sola, que es la concentración de ácido no dissociado, obteniéndose de este modo un buen ajuste de las ecuaciones a los datos experimentales.
- 12 . Mediciones del contenido de ácido sórbico en carne refrigerada no mostraron variaciones en la concentración del preservador durante el período de almacenamiento. Los ensayos realizados en carne cocida arrojaron resultados similares a los obtenidos en crudo, no existiendo, por lo tanto, una disminución del nivel de sorbato por el proceso de cocción.
- 13 . Teniendo en cuenta que el consumo de carne promedio por habitante y por año en los países compradores de carnes argentinas es de 26.4 kg/hab.año y que el residuo producido por una solución de sorbato al 7% es de 928 mg/kg de carne, resulta una ingesta diaria de 67.7 mg de sórbico, muy por debajo de los niveles admitidos en la Ingesta Diaria Admisible (IDA: 25 mg/kg de peso corporal).
- 14 . A través de la evaluación de la relación Riesgo/Beneficio, respecto al em

pleo del sorbato de potasio en carne bovina, se puede concluir que, los riesgos dentro de los niveles recomendados en este trabajo, serían míni mos pues la cantidad que llegaría a ingerirse es pequeña. La incidencia del costo del preservador sobre el precio de venta de la carne destinada a exportación es de 0.81%, aproximadamente. Los beneficios serían la ob tención de un producto de óptima calidad con una vida útil mayor, lo que posibilitaría la comercialización durante períodos más extensos.

N. Z. Zaritzky

Mario Elvira Samuira

BIBLIOGRAFIA

- Alford, J.A., Smith, J.L. y Lilly, H.D. 1971. Relationships of microbial activity to changes in lipids in foods. J. Appl. Bacteriol. 34:133.
- Andersson, R.E., Bodin, H.G. y Snygg, B.G. 1980. The effect of some preservatives on growth, lipase production and lipase activity of Pseudomonas fluorescens. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 6:161.
- Andrews, M.M., Guthneck, B.T., Mc Bride, B.H. y Schweigert, B.S. 1952. Stability of certain respiratory and glycolytic enzyme systems in animal tissues. J. Biol. Chem. 194: 715.
- Atkinson, J.L., Follett, M.J. y Ratcliff, P.W. 1969. Postmortem changes in oxygen uptake and NAD content of lamb muscularis semimembranosus. Nature 223: 1372.
- Ayres, J.C. 1960. Temperature relationships and some other characteristics of the microbial flora developing on refrigerated beef. Food Res. 25:1.
- Baldock, J.D., Frank, P.R., Graham, P.P. e Ivey, F.J. 1979. Potassium sorbate as a fungistatic agent in country ham processing. J. Food Prot. 42:780.
- Bendall, J.R. 1980. The electrical stimulation of carcasses of meat animals. En "Devèlopmènts in Meat Science" - 1. Lawrie, R. (Ed.) p. 37. Applied Science Publishers. Ltd. London.
- Bendall, J.R. y Taylor, A.A. 1972. Consumption of oxygen by the muscles of beef animals and related species. 2. Consumption of oxygen by post-rigor muscle. J. Sci. Food Agric. 23:707.

- Bevilacqua, A.E. y Zaritzky, N.E. 1985. Efecto de la difusión de oxígeno en la coloración superficial de carnes. XIII Jornadas sobre Investigación en Ciencias de la Ingeniería Química y Química Aplicada. San Juan.
- Blocher, J.C., Busta, F.F. y Sofos, J.N. 1982. Influence of potassium sorbate and pH on ten strains of Type A and B Clostridium botulinum. J. Food Sci. 47:2028.
- Bodwell, C.E., Pearson, A.M. y Fennell, R.A. 1965a. Postmortem changes in muscle. 1. Chemical changes in beef. J. Food Sci. 30:766.
- Bodwell, C.E., Pearson, A.M. y Fennell, R.A. 1965b. Postmortem changes in muscle. 3. Histochemical observations in beef and pork. J. Food Sci. 30:944.
- Bolz, R.E. y Tuve, G.L. 1980. Handbook of Tables for Applied Engineering Science. 2ª Edition. CRC Press, Inc.
- Boyd, J.W. y Tarr, H.L.A. 1955. Inhibition of mold and yeast development in fish products. Food Technol. 9:411.
- Brooks, J. 1929. Postmortem formation of methaemoglobin in red muscle. Biochem. J. 23:1391.
- Butler, J.L., Stewart, J.C., Vanderzant, C., Carpenter, Z.L. y Smith, G.C. 1979. Attachment of microorganisms to pork skin and surfaces of beef and lamb carcasses. J. Food Prot. 42:401.
- Campbell, R.J., Egan, A.F., Grau, F.H. y Shay, B.J. 1979. The growth of Microbacterium thermosphactum on beef. J. Appl. Bacteriol. 47:505.
- Casman, E.P., McCoy, D.W. y Brandly, P.J. 1963. Staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. Appl. Microbiol. 12:363.

- Clark, D.S. y Lentz, C.P. 1969. The effect of carbon dioxide on the growth of slime producing bacteria on fresh beef. Can. Inst. Food Technol. J.2:72.
- Clark, D.S. y Lentz, C.P. 1972. Use of carbon dioxide for extending shelf-life of prepackaged beef. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 5:175.
- Clark, D.S. y Lentz, C.P. 1973. Use of mixtures of carbon dioxide and oxygen for extending shelf-life of prepackaged fresh beef. J. Inst. Can. Sci. Technol. Alim. 6:194.
- Collins-Thompson, D.L. y Rodríguez López, G. 1982. Control of Brochthrix thermosphacta by Lactobacillus species in vacuum packed bologna, Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 15:307.
- Cunningham, F.E. 1979. Shelf-life and quality characteristics of poultry parts dipped in potassium sorbate. J. Food Sci. 44:863.
- Cunningham, F.E. 1981. Microbiology of poultry parts dipped in potassium sorbate. Poultry Sci. 60:969.
- Cutaia, A.J. y Ordal, Z.J. 1964. Pigment changes in anaerobically packaged ground beef. Food Technol. 18:163.
- Cheah, K.S. y Cheah, A.M. 1971. Postmortem changes in structure and function of ox mitochondria. 1. Electron microscopic and polarographic investigation. J. Bioenergetics 2:85.
- Christopher, F.M., Seideman, S.C., Carpenter, Z.L., Smith, G.C. y Vanderzant, C. 1979a. Microbiology of beef packaged in various gas atmospheres. J. Food Prot. 42:240.
- Christopher, F.M., Vanderzant, C., Carpenter, Z.L. y Smith, G.C. 1979b. Microbiology of pork packaged in various gas atmospheres. J. Food Prot. 42:323.

- Dainty, R.H., Shaw, B.G., Harding, D.Ch. y Michanie, S. 1979. The spoilage of vacuum-packed beef by cold tolerant bacteria. En "Cold Tolerant Microbes in Spoilage and The Environment". Russel, A.D. y Fuller, R. (Ed.) p. 83. Society For Applied Bacteriology. Technical Series N°13. Academic Press-
- de Man, J.M., Voisey, P.W., Rasper, V.F., Stanley, D.W. 1976. "Rheology and Texture in Food Quality". The Avi Publishing Company, Inc.
- Deuel, H.J., Alfin-Slater, R., Weil, C.S. y Smyth, H.F. 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. I. Harmlessness of sorbic acid as a dietary component. Food Res. 19:1.
- De Vore, D.P. y Solberg, M. 1974. Oxygen uptake in postrigor bovine muscle. J. Food Sci. 39:22.
- Draper, N.R. y Smith, H. 1981. "Applied Regression Analysis" 2nd. Edition. John Wiley & Sons.
- Drieux, H. 1976. Froid et hygiène des produits d'origine animale. Bulletin Académie Vétérinaire de France 49:263.
- Effenberger, G. y Schotte, K. 1972. "Empaquetado de la Carne y los Productos Cárnicos". Ed. Acribia.
- Egan, A.F., Ford, A.L. y Shay, B.J. 1980. A comparison of Microbacterium thermosphactum and lactobacilli as spoilage organisms of vacuum-packaged sliced luncheon meats. J. Food Sci. 45:1745.
- Eklund, T. 1980. Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. J. Appl. Bacteriol. 48:423.
- Eklund, T. 1983. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. J. Appl. Bacteriol. 54:383.
- Eustace, I.J. 1981. Some factors affecting oxygen transmission rates of plastic films for vacuum packaging of meat. J. Food Technol. 16:73.
- Firstenberg-Eden, R., Notermans, S. y Van Schothorst, M. 1978. Attachment of certain bacterial strains to chicken and beef meat. J. Food Safety 1:217.

- Ford, A.L. y Park, R.J. 1980. Odours and flavours in meat. En "Developments in Meat Science". 1. Lawrie, R. (Ed.) p. 219. Applied Science Publishers Ltd. London.
- Freeman, L.R., Silverman, G.J., Angelini, P., Merritt, C. y Esselen, W.B. 1976. Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chickens at spoilage. Appl. Environ. Microbiol. 32:222.
- Gardner, G.A. 1966. A selective medium for the enumeration of Microbacterium thermosphactum in meat and meats products. J. Appl. Bacteriol. 29:455.
- Gill, C.O. 1976. Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. J. Appl. Bacteriol. 41:401.
- Gill, C.O. 1982. Microbial Interaction with Meats. En "Meat Microbiology" Brown M.H. (Ed.). p. 225 Applied Science Publishers Ltd. London - New York.
- Gill, C.O., Leet, N.G. y Penney, N. 1984. Structural changes developing with rigor that facilitate bacterial invasion of muscle tissue. Meat Sci. 10:265.
- Gill, C.O. y Newton, K.G. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. J. Appl. Bacteriol. 43:189.
- Gill, C.O. y Newton, K.G. 1978. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. Meat Sci. 2:207.
- Gill, C.O. y Newton, K.G. 1979. Spoilage of vacuum-packaged dark, firm, dry (DFD) meat at chill temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 37:362.
- Gill, C.O. y Penney, N. 1977. Penetration of bacteria into meat. Appl. Environ. Microbiol. 33:284.
- Gill, C.O. y Penney, N. 1982. Bacterial penetration of muscle tissue. J. Food Sci. 47:690.

- Gould, R.P. 1973. The microanatomy of muscle. En "The structure and Function of Muscle". Bourne, G.H. (Ed.). Vol. 2. Academic Press, New York.
- Grant, N. 1955. The respiratory enzymes of meat. I. Identification of the active enzymes. Food Res. 20:250.
- Grau, F.H. 1980. Inhibition of the anaerobic growth of Brochothrix thermosphacta by lactic acid. Appl. Environ. Microbiol. 40:433.
- Grecz, N. y Arvay, L.H. 1982. Effect of temperature on spore germination and vegetative cell growth of Clostridium botulinum. Appl. Environ. Microbiol. 43:331.
- Greer, G.G. 1982. Mechanism of beef shelf life extension by sorbate. J. Food Port. 45:82.
- Greig, M.E. y Hoogerheide, J.C. 1941. The correlation of bacterial growth with oxygen consumption. J. Bacteriol 41:549.
- Gunderson, M.F. y Peterson, A.C. 1977. Microbiology of frozen foods. En "Fundamentals of Food Freezing". Derosier, N. y Tressler, D. (Eds.). p. 476. Avi Publishing Co., Westport.
- Hanna, M.O., Vanderzant, C., Carpenter, Z.L. y Smith, G.C. 1977. Microbial flora of vacuum-packaged lamb with special reference to psychrotrophic, Gram-positive, catalase-positive pleomorphic rods . J. Food Production 40-98.
- Hanna, M.O., Zink, D.L., Carpenter, Z.L. y Vanderzant, C. 1976. A research note: Yersinia enterocolitica - like organisms from vacuum - packaged beef and lamb. J. Food Sci. 41:1254.
- Himmelblau, D.M. 1970. "Process Analysis by Statistical Methods". John Wiley and Sons.

- Hugh, R. y Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 66:24.
- Ingram, M. y Dainty, R.H. 1971. Changes caused by microbes in spoilage of meats. J. Appl. Bacteriol. 34:21.
- Ingram, M. y Roberts, T.A. 1976. The microbiology of the red meat carcass and the slaughterhouse. Royal Society of Health J. 96:270.
- Ivey, F.J. y Robach, M.C. 1978. Effect of potassium sorbate and sodium nitrite on Clostridium botulinum growth and toxin production in canned comminuted pork. J. Food Sci. 43:1782.
- Ivey, F.J., Shaver, K.J., Christiansen, L.N. y Tompkin, L.N. 1978. Effect of potassium sorbate on toxinogenesis of Clostridium botulinum in bacon. J. Food Prot. 41:621.
- Jay, J.M. 1970. Food preservation by use of low temperatures. En "Modern Food Microbiology". p. 137. Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- Johnson, B.Y. 1974. Chilled vacuum-packaged beef. CSIRO Food. Res. Quart. 34:14.
- Kao, C.T. y Frazier, W.C. 1966. Effecto of lactic acid bacteria on growth of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. 14:251.
- Karel, M., Issenberg, P., Ronsivalli, L. y Jusin, V. 1963. Application of gas chromatography to the measurement of gas permeability of packaging materials. Food Technol. 17:91.

- Kemp, J.D., Langlois, B.E. y Fox, J.D. 1979. Quality of boneless dry-cured hams produced with or without nitrite, netting or potassium sorbate. J. Food Sci. 44:914.
- Kilsby, D.C. y Pugh, M.E. 1981. The relevance of the distribution of microorganisms within batches of food to the control of microbiological hazards from foods. J. Appl. Bacteriol. 51:345.
- Kitchell, A.G., Ingram, G.C. y Hudson, W.R. 1973. Microbiological sampling in abattoirs. En "Sampling-Microbiological Monitoring of Environments". Board, R.G. and Lovelock, D.W. (Eds.). Academic Press, New York and London.
- Kovacs, N. 1956. Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction. Nature (London) 178:703.
- Larmond, E., Petrasovits, A. y Hill, P. 1969. Application of multiple paired comparisons in studying the effect of ageing and finish on beef tenderness. Can. J. Animal Sci. 49:51.
- La Rocco, A.K. y Martin, E.S. 1981. Effects of potassium sorbate alone and in combination with sodium chloride on the growth of Salmonella typhimurium 7136. J. Food Sci. 46:568.
- Leitsner, L. 1982. Energy conservation in the storage of carcass meat products. Meeting of International Institute of Refrigeration. Commissions E₁ - E₂. Jerusalem, March 14-19.
- Lightfoot, E.N. 1974. "Transport Phenomena and Living Systems". John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Liu, H. y Watts, B.M. 1970. Catalysis of lipid oxidation in meats. 3. Catalysis of oxidative rancidity in meats. J. Food Sci. 35:596.

- Lueck, E. 1980. "Antimicrobial Food Additives". Springer-Verlag Berlin Heidelberg - New York.
- Mac Dougall, D.B. 1971. The effect of time and storage temperature on consumer quality. 17th. European Meeting of Meat Research Workers, Bristol, p.8.1.
- Mackey, B.M., Roberts, T.A., Mandfield, J. y Farkas, G. 1980. Growth of Salmonella on chilled meat. J. Hygiene 85:115.
- Masurovsky, E.B., Goldblith, S.A. y Voss, J. 1963. Differential medium for selection and enumeration of members of the genus Pseudomonas. J. Bacteriol 85:722.
- Mc Coy, D.W. y Faber, J.E. 1966. Influence of food microorganisms on staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. Appl. Microbiol. 14:372.
- Melnick, D., Luckmann, F.H. y Gooding, C.M. 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. VI. Metabolic degradation of sorbic acid in cheese by molds and the mechanism of mold inhibition. Food Res. 19:44.
- Mermelstein, N.H. 1979. Hypobaric transport and storage of fresh meats and produce earns 1979. IFT Food Technology Industrial Achievement Award. Food Technol. 33:32.
- Mohino Sanchez, A. 1984. Aditivos en productos cárnicos, Aspectos generales e industriales. Alimentaria 151:21. Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos (España).

- Mossel, D.A.A. e Ingram, M. 1975. The physiology of the microbial spoilage of foods. J. Appl. Bacteriol 18:237.
- Myers, B.R., Edmondson, J.E., Anderson, M.E. y Marshall, R.T. 1983. Potassium sorbate and recovery of pectinolytic psychrotrophs from vacuum-packaged pork. J. Food Prot. 46:499.
- Neter, J. y Wasserman, W. 1974. "Applied Linear Statistical Models". Ed. Richard D. Irwin Inc. Homewood. IL.
- Newbold, R.P. y Scopes, R.K. 1971. Postmortem glycolysis in ox skeletal muscle: Effect of adding nicotinamide-adenine dinucleotide to diluted mince preparation. J. Food Sci. 36:215.
- Newton, K.G. y Gill, C.O. 1978a. Storage quality of dark, firm, dry meat. Appl. Environ. Microbiol. 36:375.
- Newton, K.G. y Gill, C.O. 1978b. The development of the anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. J. Appl. Bacteriol. 44:91.
- Newton, K.G. y Gill, C.O. 1980. The microbiology of DFD fresh meats: a review. Meat Sci. 5:223.
- Newton, K.G., Harrison, J.C.L. y Smith, K.M. 1977. The effect of storage in various gaseous atmospheres on the microflora of lamb chops held at - 1°C. J. Appl. Bacteriol. 43:53.
- Newton, K.G., Harrison, J.C.L. y Wauters, A.M. 1978. Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. J. Appl. Bacteriol. 45:75.
- Newton, K.G. y Rigg, W.J. 1979. The effect of film permeability on the storage life and microbiology of vacuum-packed meat. J. Appl. Bacteriol. 47:433.
- Niskanen, A. y Pohja, M.S. 1977. Comparative studies on the sampling and investigation of microbial contamination of surfaces by the contact plate and swab methods. J. Appl. Bacteriol. 42:53.

- Noskowa, G.L. 1972. 'Microbiología de las Carnes Conservadas por Frío'. Ed. Acribia.
- Notermans, S., Firstenberg-Eden, R., Van Schothorst, M. 1979. Attachment of bacteria to teats of cows. J. Food Prot. 42:228.
- Nottingham, P.M. 1982. Microbiology of Carcass Meats. En 'Meat Microbiology'. Brown, M.H. (Ed.). p. 13. Applied Science Publishers Ltd. London- New York.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 1980. Horwitz, W. (Ed.). Method 20.104.
- Park, H.S. y Marth, E.H. 1972. Inactivation of Salmonella typhimurium by sorbic acid. J. Milk Food Technol. 35:532.
- Penny, I.F. 1980. The enzymology of conditioning. En "Developments in Meat Science". 1. Lawrie, R. (Ed.). p. 115. Applied Science Publishers Ltd. London.
- Perry, J.H. 1950. Chemical Engineers' Handbook. Third Edition. Mac Graw Hill Book Company, Inc.
- Peterson, A.C., Black, J.J. y Gunderson, M.F. 1962a. Staphylococci in competition. I. Growth of naturally occurring mixed populations in precooked frozen goods during defrost. Appl. Microbiol. 10:16.
- Peterson, A.C., Black, J.J. and Gunderson, M.F. 1962b. Staphylococci in competition. II. Effect of total numbers and proportion of staphylococci in mixed cultures on growth in artificial culture medium. Appl. Microbiol. 10:23.

- Phillips, G.F. y Mundt, J.O. 1950. Sorbic acid as an inhibitor of seum yeast in cucumber fermentations. Food Technol. 4:291.
- Pierson, M.D., Collins-Thompson, D.L. y Ordal, Z.J. 1970. Microbiological, sensory and pigment changes of aerobically and anaerobically packaged beef. Food Technol. 24:1171.
- Pivnick, H. y Bird, H. 1965. Toxinogenesis by Clostridium botulinum types A y E in perishable cooked meats vacuum-packed in plastic pouches Food Technol. 19:1156.
- Reinhard, L. y Radler, F. 1981. Die Wirkung von Sorbinsäure auf *Saccharomyces cerevisiae*. II Adsorption, Desorption und Abbau von Sorbinsäure. Z. Lebensm. Unters Forsch 172:382.
- Robach, M.C. 1978. Effect of potassium sorbate on the growth of Pseudomonas fluorescens. J. Food Sci. 43:1886.
- Robach, M.C. 1979. Influence of potassium sorbate on growth of Pseudomonas putrefaciens. J. Food Prot. 42:312.
- Robach, M.C. 1980. Use of preservatives to control microorganisms in food. Food Technol. October, p.81.
- Robach, M.C. y Sofos, J.N. 1982. Use of sorbates in meat products, fresh poultry and poultry products: A review. J. Food Prot. 45:374.
- Robach, M.C. y Stateler, C.L. 1980. Inhibition of Staphylococcus aureus by potassium sorbate in combination with sodium chloride, tertiary butylhydroquinone, butylated hydroxanisole or ethylenediamine tetraacetic acid. J. Food Prot. 43:208.
- Robach, M.C., To, E.C., Meydav, S. y Cook, C.F. 1980. Effect of sorbates on microbiological growth in cooked turkey products. J. Food Sci. 45:638.

- Rosset, R. 1982. Chilling, Freezing and Thawing. En 'Meat Microbiology'. Brown, M.H. (Ed.) p. 265 .Applied Science Publishers Ltd. London-New York.
- Roth, L.A. y Clark, D.S. 1975. Effect of lactobacilli and carbon dioxide on the growth of Microbacterium thermosphactum on fresh beef. Can. J. Microbiol. 21:629.
- Seelye, R.J. y Yearbury, B.J. 1979. Isolation of Yersinia enterocolitica resembling organisms and Alteromonas putrefaciens from vacuum-packed chilled beef cuts. J. Appl. Bacteriol. 46:493.
- Seideman, S.C., Carpenter, Z.L., Smith, G.C., Dill, C.W. y Vanderzant, C. 1979. Physical and sensory characteristics of beef packaged in modified gas atmospheres. J. Food Prot. 42:233.
- Seideman, S.C., Vanderzant, C., Smith, G.C., Hanna, M.O. y Carpenter, Z.L. 1976. Effect of degree of vacuum and length of storage on the microflora of vacuum-packaged beef wholesale cuts. J. Food Sci. 41:738.
- Shaw, M.K. y Nicol, D.J. 1969. Effect of gaseous environment on the growth of meat of some food poisoning and food spoilage organisms. Proceedings of 15th European Meeting of Meat Research Workers, Helsinki; 15, p. 226.
- Sheu, C.W., Salomon, D., Simmons, J.L., Sreevalsan, T. y Freese, E. 1975. Inhibitory effects of lipophilic acids and related compounds on bacteria and mammalian cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 7:349.
- Sikes, A. y Maxcy, R.B. 1980. Post-mortem invasion of muscle food by a proteolytic bacterium. J. Food Sci. 45:293.
- Smith, J.L. y Palumbo, S.A. 1981. Microorganisms as food additives. J. Food Prot. 44:936.
- Sneath, P.H.A. y Jones, D. 1976. Brochothrix, a new genus tentatively placed in the family Lactobacillaceae. International J. of Systematic Bacteriol. 26:102.

- Sofos, J.N. 1981. Nitrite, sorbate and pH interaction in cured meat products. Presented at the 34th Reciprocal Meat Conference. June 21-24, Oregon State University, Corvallis, OR.
- Sofos, J.N. y Busta, F.F. 1980. Alternatives to the use of nitrite as an anti botulinal agent. Food Technol. 34:244.
- Sofos, J.N. y Busta, F.F. 1981. Antimicrobial activity of sorbate. J. Food Prot. 44:614.
- Sofos, J.N., Busta, F.F. y Allen, C.E. 1979 (a). Sodium nitrite and sorbic acid effects on Clostridium botulinum spore germination and total microbial growth in chicken frankfurter emulsions during temperature abuse. Appl. Environ. Microbiol. 37:1103.
- Sofos, J.N., Busta, F.F. y Allen, C.E. 1979 (b). Botulism control by nitrite and sorbate in cured meat: A review. J. Food Prot., 42:739.
- Sofos, J.N., Busta, F.F. y Allen, C.E. 1979 (c). Clostridium botulinum control by sodium nitrite and sorbic acid in various meat and soy protein formulations. J. Food Sci. 44:1662.
- Sofos, J.N., Busta, F.F. y Allen, C.E. 1980 (a). Influence of pH on Clostridium botulinum control by sodium nitrite and sorbic acid in chicken emulsions. J. Food Sci. 45:7.
- Sofos, J.N., Busta, F.F., Rhothipaska, K. y Allen, C.E. 1979 (d). Sodium nitrite and sorbic acid effects on Clostridium botulinum toxin formation in chicken frankfurter - type emulsions, J. Food Sci. 44:668.
- Sofos, J.N., Busta, F.F., Bhothipaksa, K., Allen, C.E., Robach, M.C. y Paquette, M.W. 1980 (b). Effects of various concentrations of sodium nitrite and potassium sorbate on Clostridium botulinum toxin production in commercially prepared bacon. J. Food Sci. 45:1285.

- Sutherland, J.P., Patterson, J.T., Gibbs, P.A. y Murray, J.G. 1977. The effect of several gaseous environments on the multiplication of organisms isolated from vacuum-packaged beef. J. Food Technol. 12:249.
- Sutherland, J.P., Patterson, J.T. y Murray, J.G. 1975. Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef. J. Appl. Bacteriol 39:227.
- Taylor, A.A. 1971. The gaseous environment of packaged fresh meat. Proceedings of 17th European Meeting of Meat Research Workers, Bristol, p. 662.
- Taylor, A.A. y Mac Dougall, D.B. 1973. Fresh beef packed in mixtures of oxygen and carbon dioxide. J. Food Technol. 8:453.
- Thornley, M.J. 1960. The differentiation of Pseudomonas from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bacteriol. 23:37.
- To, E.C. y Robach, M.C. 1980. Potassium sorbate dip as a method of extending shelf - life and inhibiting the growth of Salmonella and Staphylococcus aureus on fresh, whole broilers. Poultry Science 59:726.
- Tompkin, R.B., Christiansen, L.N., Shaparis, A.B. y Bolin, H. 1974. Effect of potassium sorbate on salmonellae, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens and Clostridium botulinum in cooked, uncured sausage. Appl. Microbiol. 28:262.
- Urbin, M.C. y Wilson, G.D. 1961. The post-mortem oxygen requirements of bovine tissue. J. Food Sci. 26:314.
- Vanderzant, C y Nickelson, R. 1969. A microbiological examination of muscle tissue of beef, pork, and lamb carcasses. J. Milk Food Technol. 32:357.

- Wolf, S.K. 1980. Use of CO and CO₂ - enriched atmospheres for meats, fish, and produce. Food Technol. March, p. 55.
- Zamora, M.C. 1982. Alteraciones microbiológicas en carne bovina almacenada a bajas temperaturas con películas flexibles. Tesis presentada para optar al grado de Magister Scientiae en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Zárate, J.R. y Zaritzky, N.E. 1985. Production of weep in packaged refrigerated beef. J. Food Sci. 50:155.

APENDICE 1

Tabla I : Variación de la contaminación inicial a lo largo del músculo

Músculo (Bloque) i = 1 a 3				
Rodaja (Zona) j = 1 a 4	j/i	1	2	3
	1	4.30	4.43	4.20
	2	4.45	4.33	4.15
	3	4.21	4.60	4.32
	4	4.15	4.47	4.07

Los resultados están expresados como $\log \text{ UFC/cm}^2$

Análisis de varianza

Fuente de variación	ν	Suma de cuadrados	S^2	Fexp.	F95%	F99%
Entre bloques	2	0.15	0.08	5.16	5.14	10.92
Entre zonas de un mismo bloque	3	0.03	0.01	0.73	4.76	9.78
Error	6	0.89	0.01			
Total	11					

Tabla II : Influencia de la termocontracción de la película de EVA-SARAN-EVA sobre los recuentos iniciales.

		Log UFC/cm ² ENVASE	
		NO CONTRAIDO	CONTRAIDO
R	1	4.15	4.08
O	2	4.40	4.15
D			
A	3	4.48	4.17
J			
A	4	4.30	4.21
S	5	3.95	3.85

Análisis de varianza

Fuentes de variación	v	Suma de cuadrados	S ²	Fexp.	F95%	F99%
Termocontractibilidad del envase	1	0.07	0.07	1.45	7.71	21.20
Bloque	4	0.07	0.02			
Error	4	0.187	0.05			
Total	9					

APENDICE 2

Tabla I : Crecimiento microbiano durante el almacenamiento de carne bovina envasada en polietileno a 4°C

Los datos informados son valores promedios de los recuentos microbianos correspondientes a músculos con pH comprendidos entre 5.70 y 5.90.

Microorganismos	días almacenamiento	Recuentos log UFC/cm ²	N° de animales n	desvío standard $S_{\log N}$ *
Totales (aeróbicos)	0	4.24	3	0.06
	2	4.88	3	0.08
	4	6.01	3	0.06
	7	7.22	3	0.08
<u>Pseudomonas</u> sp.	0	3.81	3	0.05
	2	4.77	3	0.07
	4	5.78	3	0.01
	7	7.06	3	0.08
<u>B. thermophilacta</u>	0	3.64	3	0.07
	2	4.27	3	0.07
	4	5.49	3	0.06
	7	6.59	3	0.15
<u>Lactobacillus</u> sp.	0	3.67	3	0.06
	2	4.20	3	0.10
	4	5.07	3	0.08
	7	5.20	3	0.13
<u>Enterobacteriaceae</u>	0	2.98	3	0.10
	2	3.76	3	0.11
	4	4.23	3	0.05
	7	4.32	3	0.08
Levaduras	0	3.02	3	0.08
	2	3.53	3	0.07
	4	4.32	3	0.08
	7	4.42	3	0.08

$$S_{\log N} = \frac{S_{\log N}}{\sqrt{n}}$$

Tabla II : Crecimiento microbiano durante el almacenamiento de carne bovina envasada en polietileno a 0°C.

Los datos informados son valores promedios de los recuentos microbianos correspondientes a músculos con pH comprendidos entre 5.70 y 5.90

Microorganismos	Días de almacenamiento	Recuentos $\log \text{UFC/cm}^2$	N° de animales n	Desvío Standard $S_{\log N}$
Totales (aeróbicos)	0	4.20	5	0.10
	3	4.23	3	0.02
	5	4.65	2	0.10
	7	5.05	2	0.05
	8	5.38	3	0.18
	9	5.63	2	0.13
	12	6.53	2	0.12
	15	7.27	3	0.17
	18	8.16	3	0.11
	22	8.21	3	0.12
<u>Pseudomonas</u> sp.	0	3.72	5	0.11
	3	3.67	3	0.12
	5	3.58	2	0.02
	7	4.31	2	0.06
	8	4.87	3	0.03
	9	5.26	2	0.06
	12	6.40	2	0.10
	15	7.23	3	0.09
	18	8.10	3	0.08
	22	8.19	3	0.06
<u>B. thermosphacta</u>	0	3.54	5	0.16
	3	3.52	3	0.04
	5	3.52	2	0.13
	7	4.40	2	0.10
	8	4.72	3	0.16
	9	5.15	2	0.13
	12	6.20	2	0.13
	15	6.63	3	0.12
	18	6.94	3	0.11
	22	7.27	3	0.18
<u>Lactobacillus</u> sp.	0	3.69	5	0.11
	3	3.50	3	0.06
	5	4.07	2	0.02
	7	4.50	2	0.10
	8	4.57	3	0.12
	9	4.76	2	0.06
	12	5.33	2	0.14
	15	5.42	3	0.12
	18	5.63	3	0.02
	22	5.46	3	0.19

Tabla II : continuación

Microorganismos	Días de almacenamiento	Recuentos log UFC/cm ²	Nº de animales n	Desvío Standard $S_{\log N}$
<u>Enterobacteria</u> <u>ceae</u>	0	2.87	5	0.10
	3	3.05	3	0.10
	5	3.50	2	0.10
	7	4.13	2	0.13
	8	4.48	3	0.10
	9	4.69	2	0.10
	12	4.86	2	0.06
	15	5.00	3	0.12
	22	5.18	3	0.01
Levaduras	0	2.94	5	0.09
	3	2.78	3	0.04
	5	3.25	2	0.12
	7	3.67	2	0.07
	8	3.70	3	0.19
	9	4.10	2	0.10
	12	4.20	2	0.14
	15	4.25	3	0.18
	18	4.25	3	0.13
	22	4.20	3	0.14

Tabla III: Crecimiento microbiano durante el almacenamiento de carne bovina envasada en EVA-SARAN-EVA a 4°C.

Los datos informados son valores promedios de los recuentos microbianos correspondientes a músculos con pH comprendidos entre 5.60 y 5.90.

Microorganismos	Días de almacenamiento	Recuentos log UFC/cm ²	Nº de animales n	Desvío Standard $S_{\log N}$
Totales (aeróbicos)	0	4.13	10	0.04
	3	4.08	8	0.04
	5	4.46	8	0.06
	7	5.10	9	0.11
	10	5.74	8	0.11
	12	6.52	6	0.08
	14	7.02	5	0.10
	18	7.50	4	0.14
	21	7.52	6	0.10
<u>Pseudomonas</u> sp.	0	3.73	6	0.04
	3	3.55	4	0.07
	5	3.70	5	0.06
	7	4.14	5	0.04
	10	4.79	5	0.08
	12	5.30	2	0.05
	14	5.34	3	0.08
	18	5.32	4	0.12
	21	5.39	5	0.08
<u>B. thermosphacta</u>	0	3.57	5	0.07
	3	3.51	4	0.03
	5	3.98	4	0.09
	7	4.61	4	0.13
	10	5.30	4	0.10
	12	5.43	3	0.18
	14	5.28	3	0.02
	18	5.36	2	0.12
	21	5.34	4	0.06
<u>Lactobacillus</u> sp.	0	3.61	6	0.05
	3	3.44	5	0.10
	5	4.00	5	0.08
	7	4.62	5	0.07
	10	5.47	5	0.07
	12	6.16	3	0.17
	14	7.00	4	0.09
	18	7.39	4	0.09
	21	7.40	6	0.11

Tabla III: continuación

Microorganismos	Días de almacenamiento	Recuentos log UFC/cm ²	N° de animales n	Desvío Standard $S_{\log N}$
<u>Enterobacteriaceae</u>	0	2.86	4	0.05
	3	2.85	3	0.08
	5	3.50	2	0.09
	7	4.17	3	0.12
	10	4.88	4	0.09
	12	5.22	2	0.13
	14	5.37	3	0.11
	18	5.43	2	0.07
	21	5.45	3	0.05
Levaduras	0	2.92	6	0.05
	3	3.06	4	0.14
	5	3.62	5	0.06
	7	3.78	5	0.07
	10	4.18	5	0.11
	12	4.54	3	0.02
	14	4.88	4	0.10
	18	4.85	2	0.05
	21	4.93	6	0.06
Anaeróbicos	0	3.46	4	0.13
	3	3.59	3	0.15
	5	4.10	3	0.05
	7	4.71	4	0.17
	10	5.51	3	0.17
	12	6.20	3	0.07
	14	6.60	2	0.10

Tabla IV : Crecimiento microbiano durante el almacenamiento de carne bovina enva-
sada en EVA-SARAN-EVA a 0°C.

Los datos informados son valores promedios de los recuentos microbia-
nos correspondientes a músculos con pH comprendidos entre 5.60 y 5.90

Microorganismos	Días de almacenamiento	Recuentos log UFC/cm ²	N° de animales n	Desvío Standard $S_{\log N}$
Totales (aeróbicos)	0	4.27	7	0.05
	7	4.10	6	0.11
	12	4.25	2	0.13
	14	4.36	6	0.07
	21	5.22	3	0.18
	24	5.60	2	0.05
	28	6.50	3	0.10
	32	6.65	5	0.14
	38	7.05	2	0.05
	40	7.40	4	0.18
	48	7.50	3	0.13
	62	7.45	2	0.10
<u>Pseudomonas</u> sp.	0	3.79	7	0.08
	7	3.44	6	0.13
	12	3.50	2	0.10
	14	3.88	6	0.04
	21	4.27	3	0.17
	24	4.35	2	0.10
	28	4.48	3	0.08
	32	4.73	4	0.12
	38	5.13	2	0.07
	40	5.00	4	0.12
	48	5.10	2	0.01
	62	4.98	2	0.01
<u>B. thermosphacta</u>	0	3.72	3	0.07
	7	3.35	2	0.05
	12	3.47	2	0.10
	14	3.90	3	0.08
	21	4.57	3	0.07
	24	4.94	2	0.04
	32	5.08	3	0.13
	38	5.14	2	0.13
	48	5.10	2	0.10
	62	4.60	2	0.07

Tabla IV : continuación

Microorganismos	Días de almacenamiento	Recuentos log UFC/cm ²	N° de animales n	Desvío Standard $S_{\log N}$
<u>Lactobacillus</u> sp.	0	3.75	3	0.06
	7	3.35	3	0.05
	12	3.40	2	0.10
	14	3.94	3	0.08
	21	4.67	3	0.13
	24	5.45	2	0.05
	28	6.10	3	0.10
	32	6.35	2	0.10
	38	7.02	2	0.06
	40	7.21	3	0.18
	48	7.36	3	0.13
	62	7.40	2	0.04
<u>Enterobacteriaceae</u>	0	3.00	3	0.15
	7	3.05	2	0.05
	12	3.21	2	0.10
	14	3.42	3	0.09
	24	4.73	2	0.13
	32	5.75	2	0.05
	38	5.67	2	0.04
	48	5.54	2	0.05
Levaduras	0	3.00	3	0.10
	7	2.75	3	0.13
	12	2.95	2	0.05
	14	3.17	3	0.07
	24	3.72	2	0.07
	32	3.63	2	0.02
	38	3.78	2	0.02
	48	3.63	2	0.05
	62	3.45	2	0.05
Anaerobios	0	3.80	4	0.12
	7	3.79	4	0.17
	14	3.99	3	0.14
	21	5.19	3	0.18
	24	5.50	2	0.10
	28	6.25	2	0.10
	32	6.66	3	0.12
	40	7.23	3	0.18

APENDICE 3

3.a Intervalo de confianza de los parámetros c, d de la regresión $y = c + dx$

$$S_r^2 = \frac{\sum (y_i \text{ exp} - y_i \text{ predicho})^2}{n - 2}$$

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum (y_i \text{ exp} - y_{\text{predicho}})^2}{n - 2}} = \text{desví standard a lo largo de la regre} \\ \text{sión}$$

ordenada al origen:

$$c \pm "t" (n-2) (1 - 1/2\alpha) \cdot S_r \left[\left(\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right) \right]^{1/2}$$

pendiente:

$$d \pm "t" \cdot S_r / \left[\sum (x_i - \bar{x})^2 \right]^{1/2}$$

3.b Análisis de la existencia de diferencias significativas entre dos regresiones lineales (Neter y Wasserman, 1974)

Dadas las regresiones lineales correspondientes a los tratamientos 1 y 2 con n_1 y n_2 datos experimentales respectivamente

- 1) Se calcula la suma de cuadrados de cada regresión

$$SC_{T_1} = \sum_{i=1}^{n_1} (y_{\text{pred. } i_1} - y_{\text{exp. } i_1})^2; \quad v_1 = n_1 - 2$$

$$SC_{T_2} = \sum_{i=1}^{n_2} (y_{\text{pred. } i_2} - y_{\text{exp. } i_2})^2; \quad v_2 = n_2 - 2$$

- 2) Se determina la regresión lineal de los tratamientos 1 y 2 combinados calculándose la suma de cuadrados correspondiente

$$SC_{T_{1-2}} = \sum_{i=1}^{n_1+n_2} (y_{\text{pred. } i} - y_{\text{exp. } i})^2$$

- 3) Cálculo del estadístico F

$$F_{\text{exp.}} = \frac{SC_{T_{1-2}} - (SC_{T_1} + SC_{T_2})}{2} \quad / \quad \frac{(SC_{T_1} + SC_{T_2})}{n_1 + n_2 - 4}$$

- 4) El $F_{\text{exp.}}$ debe compararse con F teórico al nivel de significación adecuado.

$$(v \text{ numerador} = 2; \quad v \text{ denominador} = n_1 + n_2 - 4)$$

En el caso que $F_{\text{exp.}} < F \text{ teórico}$ se acepta la hipótesis nula es decir las dos regresiones no presentan diferencias significativas.

APENDICE 4

Tabla I : Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de los microorganismos totales durante el almacenamiento en Polietileno a 0°C - pH de la carne = 5.70

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	4.43 ^b	4.36 ^b	4.30 ^b	
	3	4.60	4.37	4.55	
	8	5.70	5.54	4.90	
	15	7.52	7.34	6.95	
	18	8.30	7.85	8.00	
	22	8.40	8.22	8.00	
Sorbato 0.30%	0	4.43 ^c	4.36 ^b	4.30 ^b	
	3	4.50	5.10	4.30	
	8	5.60	5.25	5.50	
	15	7.40	7.50	7.35	
	18	8.30	7.83	8.15	
	22	8.30	8.29	8.03	
Sorbato 0.43%	0	4.36 ^b	4.30 ^b	4.18 ^b	4.50 ^b
	3	4.50	5.07	4.25	----
	8	5.10	5.51	5.00	5.45
	15	6.80	7.21	7.30	6.75
	18	----	7.90	7.50	7.39
	22	8.20	8.01	8.15	8.33
Sorbato 0.50%	0	4.18 ^b	4.50 ^b	4.15 ^c	4.30 ^c
	3	4.50	4.67	4.20	----
	8	4.98	5.61	4.95	5.21
	15	6.71	7.14	6.67	7.40
	18	----	7.58	7.32	7.60
	22	8.15	8.24	8.20	8.34
Sorbato 0.76%	0	4.18 ^b	4.50 ^b	4.15 ^c	4.30 ^c
	3	4.30	4.60	4.15	----
	8	4.95	5.05	4.90	4.62
	15	6.70	6.46	6.60	6.30
	18	7.47	7.25	7.15	7.32
	22	7.90	8.04	7.91	8.19
Sorbato 1.0%	0	4.10 ^b	4.21 ^b	4.30 ^c	
	3	4.38	4.27	4.30	
	8	4.87	4.50	4.65	
	15	6.44	6.29	6.30	
	18	6.90	----	6.75	
	22	7.70	7.65	7.90	

Tabla I : continuación

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Sorbato 2.70%	0	4.30 ^c	4.10 ^b	4.21 ^b	
	3	4.30	4.47	4.16	
	8	4.50	4.78	4.43	
	15	5.80	5.42	5.65	
	18	6.32	6.25	----	
	22	7.00	6.59	7.05	
Sorbato 3.0%	0	4.30 ^c	4.10 ^b	4.21 ^b	4.30 ^c
	3	4.00	3.96	4.10	3.93
	8	4.40	4.69	4.21	4.62
	15	5.23	5.30	5.28	5.25
	18	5.76	5.95	----	6.00
	22	6.09	6.15	6.60	6.66

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento		Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos	Coefficiente de correlación	Desvío Standard de la regresión
		Ordenada al origen	Pendiente	(n)	(r)	(Sr)
Control	A	3.24	0.267	9	0.97	0.301
Sorbato 0.30%	A	3.33	0.267	9	0.99	0.176
Sorbato 0.43%	A	3.38	0.237	11	0.97	0.259
Sorbato 0.50%	A	3.32	0.238	11	0.97	0.292
Sorbato 0.76%	B	2.95	0.240	12	0.99	0.160
Sorbato 1.0%	C	2.93	0.222	8	0.99	0.152
Sorbato 2.70%	D	3.21	0.167	11	0.98	0.185
Sorbato 3.0%	E	3.33	0.138	15	0.97	0.205

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$ (Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

Control 0.43% Sorbato:	F exp. = 2.41	F teórico = 3.63	$v_1 = 2$	$v_2 = 16$	nivel = 0.05
" 0.50% "	" = 3.22	" = 3.63	$v_1 = 2$	$v_2 = 16$	" "
" 0.76% "	" = 21.26	" = 3.59	$v_1 = 2$	$v_2 = 17$	" "
0.76% - 1.0%	" = 7.45	" = 3.63	$v_1 = 2$	$v_2 = 16$	" "
2.70% - 3.0%	" = 10.7	" = 3.44	$v_1 = 2$	$v_2 = 22$	" "

Tabla II : Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de *Pseudomonas* sp. durante el almacenamiento en Polietileno a 0°C - pH de la carne = 5.70

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	4.00 ^b	3.77 ^b	3.60 ^b	
	3	4.20	3.70	3.60	
	8	4.80	4.70	4.90	
	15	7.40	7.10	7.20	
	18	8.30	8.05	8.10	
	22	8.32	8.17	8.10	
Sorbato 0.30%	0	4.00 ^c	3.77 ^b	3.60 ^b	
	3	4.20	3.68	3.59	
	8	5.10	4.90	4.70	
	15	7.20	6.91	7.00	
	18	7.93	8.00	7.79	
	22	7.95	8.31	8.07	
Sorbato 0.43%	0	3.77 ^b	3.60 ^b	3.79 ^b	4.08 ^b
	3	3.70	3.65	3.94	----
	8	4.80	5.06	4.90	5.01
	15	6.70	6.88	6.26	6.39
	18	----	7.45	7.98	7.90
	22	8.15	7.98	8.27	8.04
Sorbato 0.50%	0	4.08 ^b	3.90 ^c	3.75 ^c	
	3	3.60	3.99	----	
	8	4.80	4.60	4.95	
	15	6.10	6.37	6.70	
	18	7.60	7.41	7.33	
	22	8.02	7.90	8.00	
Sorbato 0.76%	0	3.79 ^b	4.00 ^b	3.90 ^c	3.75 ^c
	3	4.25	3.67	3.95	----
	8	4.75	4.83	4.90	4.49
	15	6.70	6.35	6.51	6.48
	18	----	7.25	7.38	7.23
	22	8.15	7.67	7.80	7.95
Sorbato 1.0%	0	3.79 ^b	3.60 ^b	4.00 ^c	
	3	3.56	3.88	4.00	
	8	4.74	4.46	4.65	
	15	6.40	6.55	6.30	
	18	7.04	7.12	7.29	
	22	8.03	7.58	7.90	

Tabla II: continuación

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Sorbato 2.70%	0	4.00 ^c	3.79 ^b	3.60 ^b	
	3	3.65	3.50	3.85	
	8	4.50	4.37	4.00	
	15	5.80	5.38	5.27	
	18	6.10	6.29	6.56	
	22	7.20	6.80	6.91	
Sorbato 3.0%	0	4.00 ^c	3.79 ^b	3.60 ^b	4.00 ^c
	3	3.69	3.55	3.77	3.97
	8	4.35	4.20	3.95	3.85
	15	4.80	4.34	4.92	4.90
	18	6.39	6.20	-----	6.07
	22	6.00	6.07	6.70	6.50

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos	Coeficiente de correlación	Desvío Standard de la regresión	
	Ordenada al origen	Pendiente	(n)	(r)	(Sr)	
Control	A	2.28	0.318	9	0.99	0.270
Sorbato 0.30%	A	2.49	0.301	9	0.99	0.146
Sorbato 0.43%	B	2.72	0.270	11	0.97	0.290
Sorbato 0.50%	B	2.66	0.260	9	0.98	0.241
Sorbato 0.76%	C	2.71	0.254	11	0.99	0.138
Sorbato 1.0%	C	2.59	0.254	9	0.99	0.123
Sorbato 2.70%	D	2.67	0.197	12	0.98	0.226
Sorbato 3.0%	E	2.53	0.179	15	0.92	0.424

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$ (Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

Control-0.30% Sorbato:	F exp. = 2.27	F teórico = 3.74	$v_1 = 2$	$v_2 = 14$	nivel = 0.05
" -0.43% "	" = 5.28	" = 3.63	$v_1 = 2$	$v_2 = 16$	" "
0.43% - 0.50% "	" = 1.38	" = 3.63	$v_1 = 2$	$v_2 = 16$	" "
0.76% - 1.0% "	" = 2.11	" = 3.63	$v_1 = 2$	$v_2 = 16$	" "
2.70% - 3.0% "	" = 5.18	" = 3.03	$v_1 = 2$	$v_2 = 23$	" "

Tabla III: Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de *B. thermosphacta* durante el almacenamiento en polietileno a 0°C pH de la carne = 5.70

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	4.00 ^b	3.49 ^b	3.40 ^b	
	3	3.60	3.46	3.50	
	8	4.50	4.20	4.25	
	15	6.80	6.48	6.30	
	18	6.75	6.50	6.38	
	22	7.22	7.00	7.60	
Sorbato 0.30%	0	4.00 ^c	3.49 ^b	3.40 ^b	
	3	4.00	3.31	3.40	
	8	4.24	4.50	4.30	
	15	6.40	6.39	6.78	
	18	6.50	6.43	6.70	
	22	7.05	7.45	7.50	
Sorbato 0.43%	0	3.49 ^b	3.40 ^b	3.61 ^b	3.96 ^b
	3	4.00	3.60	----	3.56
	8	4.30	4.20	4.55	3.92
	15	6.30	6.50	5.90	6.15
	18	----	6.48	6.40	6.22
	22	7.10	7.64	7.18	----
Sorbato 0.50%	0	3.61 ^b	3.96 ^b	3.85 ^c	3.75 ^c
	3	3.90	3.70	3.45	----
	8	3.90	4.16	4.32	4.04
	15	6.00	5.41	5.33	5.83
	18	----	6.27	6.40	6.20
	22	6.25	6.47	6.44	----
Sorbato 0.76%	0	3.61 ^b	3.96 ^b	3.85 ^c	3.75 ^c
	3	3.70	3.65	3.47	----
	8	4.17	4.00	4.33	3.90
	15	5.30	5.65	5.30	5.51
	18	6.00	----	6.11	6.40
	22	6.30	6.56	6.50	----
Sorbato 1.0%	0	3.79 ^b	3.85 ^b	4.00 ^c	
	3	----	3.60	3.50	
	8	3.50	3.98	3.60	
	15	5.00	4.51	4.50	
	18	6.00	----	5.62	
	22	6.08	5.93	5.80	

Tabla III: continuación

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ²			a
Sorbato 2.70%	0	3.90 ^c	3.79 ^b	3.85 ^b	
	3	3.60	-----	3.00	
	8	3.80	3.25	3.58	
	15	4.40	4.37	4.45	
	18	4.45	4.59	-----	
	22	5.51	5.80	5.70	
Sorbato 3.0%	0	3.90 ^c	3.79 ^b	3.85 ^b	4.00 ^c
	3	3.18	3.61	3.03	-----
	8	3.55	3.39	3.25	3.66
	15	3.95	4.05	4.15	3.99
	18	4.31	4.25	-----	4.35
	22	5.03	5.00	5.30	5.60

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos	Coeficiente de correlación	Desvíο Standard de la regresión	
	Ordenad al origen	Pendiente	(n)	(r)	(Sr)	
Control	A	1.79	0.315	6	0.99	0.212
Sorbato 0.30%	A	1.86	0.311	6	0.99	0.184
Sorbato 0.43%	A	1.99	0.281	8	0.98	0.257
Sorbato 0.50%	B	2.35	0.220	8	0.96	0.261
Sorbato 0.76%	B	2.46	0.203	11	0.98	0.185
Sorbato 1.0%	C	2.08	0.191	8	0.93	0.361
Sorbato 2.70%	D	2.29	0.144	11	0.95	0.267
Sorbato 3.0%	E	2.37	0.121	15	0.94	0.256

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$
(Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

Control-0.43% Sorbato:	F exp. = 1.67	F teórico = 4.10	$v_1 = 2$	$v_2 = 10$	nivel = 0.05
" -0.50% "	" = 6.35	" = "	$v_1 = 2$	$v_2 = "$	" "
0.50% - 0.76%	" = 0.59	" = 3.68	$v_1 = 2$	$v_2 = 15$	" "
0.76% - 1.0%	" = 9.16	" = "	$v_1 = 2$	$v_2 = "$	" "
2.70% - 3.0%	" = 4.61	" = "	$v_1 = 2$	$v_2 = "$	" "

Tabla IV : Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de los microorganismos totales durante el almacenamiento en EVA-SARAN -EVA a 4°C.

a) pH de la carne = 5.70

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	4.30 ^b	4.15 ^b	4.25 ^b	4.02 ^b
	3	4.30	3.90	----	4.15
	5	4.41	----	4.30	4.36
	7	----	5.00	5.03	4.70
	10	5.69	5.45	5.20	5.60
	12	6.15	----	----	6.30
	14	----	6.90	6.80	7.00
	18	7.50	----	7.30	----
	21	7.75	7.50	7.35	7.15
	24	----	7.65	----	----
	26	7.50	----	----	----
	33	7.29	----	----	----
	40	----	7.50	7.25	----
Sorbato 0.21%	0	4.25 ^b	4.38 ^b		
	3	4.00	4.20		
	5	4.60	4.30		
	7	5.00	4.59		
	10	5.60	5.42		
	12	6.30	6.60		
	14	6.75	6.90		
	21	7.28	7.40		
	40	7.33	----		
Sorbato 0.30%	0	4.38 ^b	4.40 ^b		
	3	4.40	4.03		
	5	4.55	4.00		
	7	5.12	4.54		
	10	5.40	5.25		
	14	6.90	6.70		
	21	7.25	----		
Sorbato 0.43%	0	4.38 ^b	4.40 ^b	4.00 ^b	4.20 ^c
	3	4.15	4.43	4.30	4.05
	5	4.25	4.50	4.20	3.92
	7	4.45	4.90	4.50	4.30
	10	5.45	5.76	5.10	5.13
	12	6.30	6.20	5.80	6.00
	14	6.80	6.70	6.31	6.50
	18	----	----	7.40	----
	21	7.05	7.25	7.10	7.20

Tabla IV : a) continuación

Tratamiento	Días almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Sorbato 0.76%	0	4.25 ^b	4.40 ^b	4.00 ^b	4.20 ^c
	3	----	4.30	4.15	----
	5	4.20	----	4.02	3.90
	7	4.21	4.60	4.20	4.00
	10	4.60	4.80	4.50	4.21
	12	----	5.15	5.60	5.32
	14	6.28	5.90	6.05	6.11
	18	6.85	7.00	7.20	6.75
	21	6.90	7.13	----	----
	40	6.95	----	----	7.10
Sorbato 3.0%	0	4.30 ^b	4.15 ^b	4.00 ^c	4.20 ^c
	3	----	3.80	3.50	4.00
	5	4.00	----	4.12	----
	7	4.33	4.20	----	4.00
	10	----	4.47	4.25	----
	12	4.60	----	----	4.20
	14	5.16	5.30	4.90	5.00
	18	6.20	5.70	----	6.01
	21	7.00	6.90	6.50	6.49
	24	----	7.00	----	----
	26	6.90	----	7.02	----
	33	7.10	----	----	----
	40	----	6.85	----	----
Sorbato 4.0%	0	4.15 ^b	4.00 ^c	4.20 ^c	
	3	----	3.80	----	
	5	3.90	4.00	3.90	
	7	4.01	----	----	
	10	4.29	4.00	4.10	
	12	----	4.25	4.05	
	14	4.00	4.30	----	
	18	5.45	5.82	5.30	
	21	----	6.00	5.90	
	24	6.80	----	6.40	
	26	----	6.81	6.69	
Sorbato 5.0%	0	4.40 ^b	4.15 ^c	4.00 ^c	
	7	3.90	3.80	----	
	10	4.10	3.90	4.00	
	14	4.30	4.00	4.30	
	20	----	4.62	4.20	
	24	4.95	----	5.45	
	28	6.05	6.21	6.50	
	32	6.70	7.00	6.50	
	38	6.55	6.95	6.80	

Tabla IV : a) continuación

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a		
Sorbato 10.0%	0	4.40 ^b	4.15 ^c	4.00 ^c
	7	----	----	----
	10	3.70	3.90	3.80
	14	3.90	3.90	3.60
	20	----	3.78	4.30
	24	4.00	4.25	----
	28	4.15	4.41	4.40
	34	4.52	4.40	----
	38	4.45	4.20	----

- a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto
b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras
c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento		Parámetros correspondiente a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
		Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	2.93	0.273	15	0.98	0.187
Sorbato 0.21%	A	2.94	0.277	10	0.97	0.224
Sorbato 0.30%	A	2.85	0.273	8	0.96	0.311
Sorbato 0.43%	A	2.67	0.276	20	0.95	0.299
Sorbato 0.76%	B	2.19	0.266	15	0.93	0.311
Sorbato 3.0%	C	1.56	0.246	13	0.97	0.226
Sorbato 4.0%	D	1.04	0.236	9	0.96	0.279
Sorbato 5.0%	E	0.50	0.199	10	0.96	0.277

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$ (Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

Control - 0.43% Sorbato: $F_{exp.} = 3.06$ $F_{teórico} = 3.31$ $v_1 = 2$ $v_2 = 31$ nivel = 0.05
0.43% - 0.76% Sorbato: $F_{exp.} = 19.83$ $F_{teórico} = 3.31$ " " "

Tabla IV: b) pH de la carne = 5.80

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a		
Control	0	4.30 ^b	4.10 ^b	4.00 ^b
	3	4.15	-----	4.00
	5	4.46	4.20	4.38
	7	5.10	5.00	5.70
	10	6.40	6.20	6.00
	14	7.20	6.80	6.90
	18	7.65	7.26	7.45
	21	-----	7.40	-----
Sorbato 0.76%	0	4.30 ^b	4.15 ^c	4.01 ^c
	3	4.15	-----	4.00
	5	4.15	4.30	3.90
	7	4.85	4.80	4.50
	10	5.40	5.85	5.50
	14	6.61	6.62	6.45
	18	7.45	7.10	7.20
	21	7.60	7.25	7.05
Sorbato 1.0%	0	4.30 ^b	4.15 ^c	4.01 ^c
	3	3.90	3.75	3.60
	5	4.15	3.90	3.80
	7	4.40	4.06	4.20
	10	5.26	4.79	4.90
	14	6.00	6.12	5.45
	18	7.00	7.50	6.90
	21	7.10	7.30	7.00
Sorbato 3.0%	0	4.00 ^b	4.10 ^b	4.25 ^b
	3	-----	3.75	4.00
	5	-----	3.90	-----
	7	4.00	-----	-----
	10	4.15	4.35	4.60
	14	5.50	5.80	5.95
	18	6.50	6.25	6.70
	21	7.00	6.90	7.25
Sorbato 4.0%	24	7.20	7.40	6.80
	0	4.00 ^b	4.10 ^b	4.25 ^b
	3	3.60	-----	3.90
	5	3.99	3.60	4.00
	7	4.00	3.60	-----
	10	4.25	3.80	4.00
	14	5.45	5.00	5.50
	18	6.40	5.90	6.00
Sorbato 5.0%	21	-----	6.80	6.50
	24	6.85	7.15	6.60
	0	4.00 ^b	4.25 ^b	
	7	3.80	3.93	
	10	4.15	4.00	
	12	4.00	4.50	
	14	4.78	4.81	
	18	5.00	5.39	
	21	6.10	6.35	
	26	6.50	6.75	

Tabla IV: b) continuación

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
	Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	3.18	14	0.97	0.276
Sorbato 0.76%	B	2.80	12	0.98	0.176
Sorbato 1.0%	C	2.36	12	0.97	0.271
Sorbato 3.0%	D	2.15	12	0.97	0.265
Sorbato 4.0%	E	1.76	11	0.97	0.284
Sorbato 5.0%	F	1.68	8	0.96	0.264

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$ (Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b).

Control - 0.76% sorbato: $F_{exp.} = 59.44$ $F_{teórico} = 3.44$ $v_1 = 2$ $v_2 = 22$ nivel = 0.05

0.76% - 1.0% " " = 6.99 " = 3.49 v_1 " $v_2 = 20$ " "

1.0 % - 3.0% " " = 9.54 " " v_1 " v_2 " " "

3.0 % - 4.0% " " = 5.07 " = 3.52 v_1 " $v_2 = 19$ " "

Tabla IV : c) pH de la carne = 5.90

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a		
Control	0	4.15 ^b	4.00 ^b	
	3	4.03	3.82	
	5	4.55	4.80	
	7	5.46	5.75	
	10	5.90	----	
	14	7.19	6.57	
	18	7.90	7.30	
	21	7.76	7.60	
Sorbato 0.76%	0	4.30 ^b	4.00 ^b	4.35 ^b
	3	4.13	3.80	4.05
	5	4.65	4.02	4.43
	7	5.15	4.90	4.75
	12	6.51	6.45	6.15
	18	7.50	7.10	6.98
	21	7.35	7.40	7.20
Sorbato 1.0%	0	4.30 ^b	4.00 ^b	4.35 ^b
	3	4.02	3.76	3.95
	5	4.47	4.00	3.95
	7	4.50	4.43	4.60
	12	6.20	5.71	6.15
	18	7.10	6.85	6.69
	21	7.30	7.51	7.20
Sorbato 3.0%	0	4.15 ^b	4.00 ^b	4.42 ^b
	5	4.05	3.80	4.15
	7	4.48	4.07	4.30
	10	4.80	5.00	4.95
	14	5.60	5.75	6.20
	18	7.36	6.84	7.10
	21	7.40	7.50	7.23
Sorbato 4.0%	0	4.15 ^b	4.00 ^b	4.42 ^b
	5	3.90	3.75	4.12
	7	4.00	3.90	4.10
	10	4.75	4.80	4.45
	14	5.45	5.34	5.50
	18	6.56	6.45	6.76
	21	7.10	7.18	7.25
	26	7.15	6.95	7.20
Sorbato 5.0%	0	4.35 ^b	4.00 ^b	4.42 ^b
	3	3.66	----	----
	5	4.01	3.62	4.10
	7	4.17	3.70	4.25
	10	----	4.00	4.50
	14	4.78	5.06	5.35
	18	6.13	6.21	5.98
	21	----	7.00	6.65
	24	6.85	----	----
	26	----	6.90	6.75

Tabla IV: c) continuación

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos	Coeficiente de correlación	Desvío standard de la regresión	
	Ordenanda al origen	Pendiente	(n)	(r)	(Sr)	
Control	A	3.25	0.285	9	0.98	0.260
Sorbato 0.76%	A	2.93	0.286	9	0.97	0.227
Sorbato 1.0%	B	2.69	0.275	9	0.97	0.247
Sorbato 3.0%	C	2.41	0.255	12	0.98	0.232
Sorbato 4.0%	D	2.26	0.235	12	0.99	0.151
Sorbato 5.0%	E	1.95	0.231	10	0.98	0.180

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$
(Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

Control - 0.76% sorbato	F exp. = 2.52	F teórico = 3.74	$v_1 = 2$	$v_2 = 14$	nivel = 0.05
" - 1.0 %	" = 12.42	" = "	v_1	" v_2	" "
3.0% - 4.0 %	" = 12.78	" = 3.49	v_1	" $v_2 = 20$	" "

Tabla IV : d) pH de la carne = 6.00

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	4.00 ^b	4.13 ^b	4.47 ^b	
	3	4.06	-----	4.17	
	5	4.45	4.34	-----	
	7	5.65	5.90	5.42	
	10	-----	6.08	6.52	
	12	6.87	6.31	-----	
	14	7.30	7.53	7.18	
	18	7.48	-----	7.65	
	21	-----	7.34	7.91	
	24	-----	-----	-----	
Sorbato 1.0%	0	4.00 ^b	4.30 ^b	4.17 ^b	
	3	3.87	-----	-----	
	5	4.20	4.11	4.08	
	7	-----	4.79	4.60	
	10	5.65	5.32	5.88	
	14	6.49	6.65	6.96	
	18	7.10	-----	7.35	
	21	7.38	7.25	-----	
	24	-----	7.28	7.40	
Sorbato 2.0%	0	4.00 ^b	4.30 ^b	4.17 ^b	
	3	3.85	-----	3.90	
	5	3.90	4.29	4.03	
	7	-----	4.74	4.62	
	10	5.45	5.21	5.10	
	14	6.40	6.80	6.85	
	18	7.15	7.20	-----	
	21	7.47	-----	7.16	
	24	-----	7.20	7.35	
Sorbato 3.0%	0	4.00 ^b	4.13 ^b	4.20 ^c	4.47 ^b
	3	3.80	-----	3.95	4.12
	5	4.15	4.06	-----	4.24
	7	4.64	4.75	4.25	-----
	10	-----	5.20	4.95	4.70
	12	5.95	5.75	-----	5.32
	14	6.50	6.68	6.04	6.20
	18	7.05	-----	6.95	7.27
	21	-----	7.20	-----	7.50
	24	7.00	7.20	7.33	-----
Sorbato 4.0%	0	4.00 ^b	4.13 ^b	4.20 ^c	4.47 ^b
	3	-----	-----	3.88	4.00
	5	4.00	3.95	-----	4.20
	7	4.39	4.59	4.23	-----
	10	-----	4.95	5.15	5.07
	12	5.80	5.20	-----	5.65
	14	6.28	5.55	5.60	6.10
	18	7.10	-----	7.20	6.95
	21	-----	7.15	-----	7.07
	24	7.30	7.10	7.25	-----

Tabla IV : d) continuación

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a		
	0	4.00 ^b	4.30 ^b	4.17 ^b
	3	----	----	----
	5	3.82	3.95	3.90
	7	4.00	4.20	4.25
Sorbato	10	4.70	4.43	4.34
5.0%	14	5.26	5.30	5.75
	18	6.00	6.22	6.55
	21	6.75	7.15	6.95
	24	6.93	7.20	7.00

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento		Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
		Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	3.28	0.291	14	0.97	0.305
Sorbato 1.0%	B	2.71	0.287	11	0.98	0.184
Sorbato 2.0%	B	2.61	0.284	11	0.98	0.220
Sorbato 3.0%	C	2.72	0.247	16	0.96	0.283
Sorbato 4.0%	C	2.67	0.239	16	0.97	0.243
Sorbato 5.0%	D	2.29	0.222	12	0.98	0.214

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$ (Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

Control - 1.0% Sorbato	F exp. = 16.2	F teórico = 3.47	$v_1 = 2$	$v_2 = 21$	nivel = 0.05
1.0% - 2.0% "	" = 1.00	" = 3.55	$v_1 = "$	$v_2 = 18$	" "
2.0% - 3.0% "	" = 3.86	" = 3.42	$v_1 = "$	$v_2 = 23$	" "
3.0% - 4.0% "	" = 2.86	" = 3.34	$v_1 = "$	$v_2 = 28$	" "

Tabla IV : e) pH de la carne = 6.20

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a		
Control	0	4.40 ^b	4.15 ^b	4.35 ^b
	3	4.35	----	4.30
	5	5.16	4.83	----
	7	5.68	5.26	5.30
	10	6.74	6.63	6.48
	14	7.60	7.80	----
	18	----	7.70	7.95
Sorbato 2.0%	0	4.40 ^b	4.15 ^b	4.35 ^b
	3	----	3.99	4.00
	5	4.00	----	4.10
	7	4.79	4.85	----
	10	----	6.10	6.16
	14	6.75	6.35	7.15
	18	7.30	7.20	7.70
	24	7.55	----	7.70
Sorbato 5.0%	0	4.40 ^b	4.15 ^b	4.35 ^b
	5	3.90	----	4.30
	7	4.35	4.50	4.70
	10	5.15	5.45	5.60
	14	6.20	----	6.34
	18	----	7.36	7.21
	21	7.40	7.50	7.35
Sorbato 10.0%	0	4.40 ^b	4.15 ^b	4.35 ^b
	5	----	3.80	4.00
	7	4.05	----	4.15
	10	4.25	4.50	----
	14	5.00	4.85	4.75
	18	5.71	5.26	5.68
	21	6.53	6.70	6.45
	24	7.15	7.35	7.00

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		N° de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
	Ordenada al origen	Pendiente			
Control	3.37	0.313	12	0.99	0.183
Sorbato 2.0%	2.75	0.297	9	0.96	0.340
Sorbato 5.0%	2.84	0.248	10	0.99	0.166
Sorbato 10.0%	1.45	0.238	12	0.98	0.203

Tabla V : a) continuación

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a		
Sorbato 4.0%	0	3.50 ^b	3.40 ^c	3.22 ^c
	3	-----	3.10	-----
	5	3.25	3.40	3.20
	7	3.50	-----	-----
	10	3.82	3.50	3.60
	12	-----	3.75	4.10
	14	4.25	4.60	-----
	18	5.25	5.00	5.10
	21	-----	6.15	6.10
	24	6.90	-----	6.60
	26	-----	6.75	6.70

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento		Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
		Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	2.33	0.325	18	0.99	0.163
Sorbato 0.43%	B	1.96	0.321	20	0.98	0.232
Sorbato 0.76%	C	1.79	0.277	19	0.97	0.281
Sorbato 3.0%	D	1.54	0.250	15	0.99	0.152
Sorbato 4.0%	E	1.04	0.236	11	0.98	0.195

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$
(Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

Control - 0.43% Sorbato $F_{exp.} = 7.82$ $F_{teórico} = 3.28$ $v_1 = 2$ $v_2 = 34$ nivel = 0.05

Tabla V : Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de *Lactobacillus* sp. durante el almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C.

a) pH de la carne = 5.70

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	3.76 ^b	3.50 ^b	3.74 ^b	3.20 ^b
	3	3.50	3.20	----	3.40
	5	3.90	----	4.00	4.20
	7	----	4.50	4.60	4.50
	10	5.40	5.50	5.60	5.25
	12	6.40	----	----	6.10
	14	----	7.15	6.90	7.00
	18	7.35	----	7.20	----
	21	7.20	7.50	7.25	7.10
	24	----	7.30	----	----
	26	7.50	----	----	----
	33	7.30	----	----	----
	40	----	----	7.20	----
Sorbato 0.43%	0	3.60 ^c	3.80 ^b	3.60 ^b	3.20 ^b
	3	3.25	3.25	3.40	3.40
	5	3.90	3.70	3.60	3.75
	7	4.10	4.05	3.80	4.40
	10	5.50	5.35	5.00	5.25
	12	6.20	6.30	5.75	5.90
	14	6.75	6.70	6.50	6.25
	18	----	----	----	7.50
	21	7.35	7.15	7.25	7.20
Sorbato 0.76%	0	3.74 ^b	3.60 ^c	3.60 ^b	3.20 ^b
	3	----	----	3.40	3.20
	5	3.50	3.35	----	3.66
	7	4.00	3.90	4.00	3.80
	10	4.75	4.15	4.10	4.25
	12	----	5.25	5.00	4.90
	14	5.90	6.15	5.54	5.40
	18	6.90	6.50	6.85	7.10
	21	7.05	----	7.00	----
	40	7.15	7.35	----	----
Sorbato 3.0%	0	3.76 ^b	3.50 ^b	3.40 ^c	3.22 ^c
	3	----	3.20	3.10	3.00
	5	3.46	----	3.30	----
	7	3.55	3.80	----	3.55
	10	----	4.20	3.90	----
	12	4.50	----	----	4.45
	14	5.20	4.90	5.00	5.31
	18	6.10	6.00	----	5.85
	21	7.00	6.90	6.70	6.65
	24	----	7.00	----	----
	26	7.23	----	6.96	----
	33	7.00	----	----	----
	40	----	6.90	----	----

Tabla V : b) pH de la carne = 5.90

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	3.60 ^b	3.50 ^b		
	3	3.32	3.80		
	5	4.35	4.05		
	7	4.60	4.23		
	10	5.60	----		
	12	----	5.82		
	14	7.20	----		
	18	7.64	7.35		
	21	7.80	7.57		
Sorbato 0.76%	0	3.80 ^b	3.50 ^b	3.67 ^b	
	3	3.42	3.15	3.51	
	5	3.96	3.43	3.60	
	7	4.03	3.87	4.08	
	12	5.25	5.95	5.59	
	18	6.69	7.15	7.25	
	21	7.43	7.26	7.14	
Sorbato 3.0%	0	3.60 ^b	3.30 ^b	3.75 ^b	
	5	3.55	3.04	3.38	
	7	3.60	3.55	3.80	
	10	4.25	3.90	4.51	
	14	5.10	4.90	5.70	
	18	6.21	6.60	6.88	
	21	7.10	7.15	7.20	
	26	----	7.25	7.06	
Sorbato 4.0%	0	3.60 ^b	3.30 ^b	3.75 ^b	
	5	3.25	3.02	3.35	
	7	3.30	3.45	3.50	
	10	4.25	3.90	3.72	
	14	4.80	4.70	5.20	
	18	6.51	6.00	5.98	
	21	6.90	6.40	7.06	
	26	7.28	6.80	7.15	

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

Tratamiento		Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos	Coeficiente de correlación	Desvío Standard de la regresión
		Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	2.43	0.316	7	0.96	0.337
Sorbato 0.76%	B	1.77	0.317	6	0.97	0.239
Sorbato 3.0%	C	1.24	0.293	9	0.95	0.340
Sorbato 4.0%	D	1.29	0.264	12	0.97	0.279

3.0% - 4.0% Sorbato: F exp. = 3.80 F teórico = 3.59 $v_1 = 2$ $v_2 = 17$ nivel = 0.05

Tabla V : c) pH de la carne = 6.00

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	3.68 ^b	3.76 ^b	3.82 ^b	
	3	3.55	-----	3.70	
	5	4.02	3.90	-----	
	7	4.74	4.33	4.48	
	10	-----	5.66	6.01	
	12	6.30	6.20	-----	
	14	6.65	6.86	7.10	
	18	7.40	-----	7.60	
	21	-----	7.47	7.81	
Sorbato 1.0%	0	3.35 ^b	3.60 ^b	3.80 ^b	
	3	3.40	-----	-----	
	5	3.60	3.75	3.98	
	7	-----	4.15	4.41	
	10	4.35	4.77	4.95	
	14	5.81	6.33	5.68	
	18	7.35	-----	7.66	
	21	7.40	7.25	-----	
	24	-----	7.30	7.49	
Sorbato 3.0%	0	3.68 ^b	3.76 ^b	3.65 ^c	3.82 ^b
	3	-----	-----	-----	-----
	5	3.50	3.87	-----	3.80
	7	3.52	4.00	3.80	-----
	10	-----	4.43	4.72	4.51
	12	5.25	5.06	-----	4.70
	14	5.92	5.85	6.08	6.30
	18	6.74	-----	7.20	7.00
	21	-----	7.31	-----	7.40
	24	7.06	7.15	7.29	-----
Sorbato 4.0%	0	3.68 ^b	3.76 ^b	3.65 ^c	3.82 ^b
	3	-----	-----	-----	-----
	5	3.63	3.50	-----	3.72
	7	3.89	3.63	4.15	-----
	10	-----	3.72	4.07	4.21
	12	4.97	4.75	-----	5.25
	14	5.39	5.50	6.00	5.61
	18	6.40	-----	6.20	6.70
	21	-----	7.02	-----	7.15
	24	7.29	7.16	7.30	-----

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tabla V: c) continuación

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		N°de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)	
	Ordenada al origen	Pendiente				
Control Sorbato	A	2.30	0.330	12	0.98	0.204
1.0% Sorbato	B	1.89	0.300	10	0.96	0.346
3.0% Sorbato	C	1.59	0.303	16	0.98	0.128
4.0% Sorbato	D	1.30	0.294	13	0.94	0.315

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$
(Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

1.0% - 3.0% Sorbato: $F_{exp.} = 8.56$ $F_{teórico} = 3.44$ $v_1 = 2$ $v_2 = 22$ nivel = 0.05
3.0% - 4.0% Sorbato: $F_{exp.} = 16.64$ $F_{teórico} = 3.38$ $v_1 = 2$ $v_2 = 25$ nivel = 0.05

Tabla VI : Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de B. thermosphacta durante el almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C.

a) pH de la carne = 5.70

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	3.78 ^b	3.62 ^b		
	3	----	3.78		
	5	3.87	3.95		
	7	4.50	4.31		
	10	5.10	5.10		
	12	----	5.38		
	14	5.30	5.25		
	18	----	----		
	21	5.47	5.30		
	40	4.00	----		
Sorbato 0.43%	0	3.30 ^c	3.48 ^b	3.62 ^b	
	3	3.25	3.54	3.10	
	5	3.10	3.30	3.45	
	7	3.80	3.65	3.60	
	10	4.07	4.25	3.92	
	12	4.35	4.55	4.30	
	14	4.30	4.90	4.68	
	18	----	----	4.80	
	21	4.50	4.95	4.60	
Sorbato 0.76%	0	3.78 ^b	3.48 ^b	3.62 ^b	3.30 ^c
	3	----	3.05	3.15	----
	5	3.42	----	3.12	3.28
	7	3.50	3.35	3.25	3.48
	10	3.75	3.90	3.65	3.90
	12	----	4.30	3.96	4.10
	14	4.60	4.50	4.43	4.20
	18	4.65	4.90	4.70	4.58
	21	4.60	4.45	----	----
	40	2.48	----	----	2.80

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos	Coeficiente de correlación	Desvío Standard de la regresión	
	Ordenada al origen	Pendiente	(n)	(r)	(Sr)	
Control	A	2.73	0.237	6	0.99	0.07
Sorbato 0.43%	B	2.72	0.137	12	0.91	0.173
Sorbato 0.76%	C	2.59	0.123	19	0.95	0.155

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$

(Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

0.43% - 0.76% Sorbato: F exp. = 11.66 F teórico = 3.35 $v_1 = 2$ $v_2 = 27$ nivel 0.05

Tabla VI: b) pH de la carne = 5.90

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a		
Control	0	3.70 ^b		
	3	3.55		
	5	4.30		
	7	4.72		
	10	5.40		
	14	5.30		
	18	5.24		
	21	----		
Sorbato 3.0%	0	3.70 ^b	3.48 ^b	3.73 ^b
	5	3.15	3.40	3.25
	7	3.30	3.70	3.59
	10	3.25	3.72	3.50
	14	3.61	4.10	3.56
	18	3.98	4.20	4.35
	21	4.72	4.40	4.50
	26	----	4.50	4.44
Sorbato 4.0%	0	3.70 ^b	3.48 ^b	3.73 ^b
	5	3.00	3.15	3.00
	7	3.26	3.12	3.11
	10	3.50	3.23	3.10
	14	3.86	3.65	3.50
	18	4.05	3.76	3.92
	21	4.25	4.15	4.50
	26	4.30	4.20	4.58

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
	Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	2.88	4	0.99	0.127
Sorbato 3.0%	B	2.48	12	0.90	0.210
Sorbato 4.0%	B	2.40	9	0.86	0.169

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$ (Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

3.0% - 4.0% Sorbato: $F_{exp.} = 2.88$ $F_{teórico} = 3.59$ $v_1 = 2$ $v_2 = 17$ nivel = 0.05

Tabla VI : c) pH de la carne = 6.00

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	3.45 ^b	3.66 ^b	3.81 ^b	
	3	3.40	----	3.70	
	5	3.79	3.76	----	
	7	4.30	4.15	4.53	
	10	----	5.70	5.50	
	12	5.30	5.74	----	
	14	5.80	6.00	6.12	
	18	5.90	----	5.87	
	21	----	6.08	5.95	
Sorbato 3.0%	0	3.45 ^b	3.66 ^b	3.65 ^c	3.81 ^b
	3	3.31	----	3.40	3.54
	5	3.60	3.30	----	3.70
	7	4.01	3.35	3.70	----
	10	----	3.76	4.00	4.06
	12	4.55	4.40	----	4.48
	14	4.65	5.01	4.90	4.50
	18	4.87	----	5.00	4.80
	21	----	5.13	----	5.07
	24	5.00	----	5.20	5.15
Sorbato 4.0%	0	3.45 ^b	3.66 ^b	3.65 ^c	3.81 ^b
	3	----	----	3.35	3.45
	5	3.37	3.65	----	3.58
	7	3.41	3.80	3.64	----
	10	----	3.90	4.00	3.70
	12	4.04	3.96	----	4.32
	14	4.44	4.72	4.81	4.85
	18	4.60	----	4.75	5.20
	21	----	5.00	----	5.10
	24	4.90	5.08	5.20	----

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos	Coefficiente de correlación	Desvío Standard de la regresión	
	Ordenada al origen	Pendiente	(n)	(r)	(Sr)	
Control	A	2.66	0.255	11	0.95	0.287
Sorbato 3.0%	B	2.48	0.162	13	0.90	0.222
Sorbato 0.4%	B	2.44	0.153	13	0.90	0.215

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$

3.0% - 4.0% Sorbato: $F_{exp.} = 1.35$ $F_{teórico} = 3.44$ $v_1 = 2$ $v_2 = 22$ nivel = 0.05

Tabla VII : Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de Pseudomonas sp. durante el almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C.

a) pH de la carne = 5.70

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	4.00 ^b	3.80 ^b	3.67 ^b	3.90 ^b
	3	3.34	3.50	----	3.70
	5	3.67	----	3.60	3.80
	7	----	4.25	4.20	4.05
	10	4.92	4.50	4.75	4.82
	12	5.30	----	----	----
	14	----	5.25	5.30	5.52
	18	5.48	----	5.45	----
	21	5.30	5.18	----	5.65
	24	----	5.65	----	----
	26	5.30	----	----	----
	33	5.35	----	----	----
	40	----	5.00	4.90	----
Sorbato 0.76%	0	3.67 ^b	4.20 ^b	3.90 ^b	3.70 ^c
	3	----	3.70	----	----
	5	----	----	3.50	3.40
	7	3.60	3.80	3.41	3.55
	10	3.51	3.82	3.64	3.75
	12	----	----	3.90	4.31
	14	4.85	4.34	4.40	4.90
	18	5.20	5.35	5.15	5.47
	21	----	5.60	----	----
Sorbato 3.0%	0	4.00 ^b	3.80 ^b	3.60 ^c	3.96 ^c
	3	----	3.25	----	3.56
	5	3.60	----	3.30	----
	7	3.50	3.69	----	3.75
	10	----	3.75	3.55	----
	12	3.60	----	----	3.80
	14	4.48	4.32	4.35	4.55
	18	4.85	4.80	----	5.00
	21	5.10	5.00	5.25	5.30
	24	----	5.20	----	----
	26	----	----	5.17	----
	33	4.80	----	----	----
	40	----	4.75	----	----
Sorbato 4.0%	0	3.96 ^c	3.80 ^b	3.60 ^c	
	3	----	----	3.28	
	5	3.60	3.40	3.15	
	7	----	3.44	----	
	10	3.55	3.50	3.40	
	12	3.70	----	----	
	14	----	3.84	3.96	
	18	3.80	4.05	3.90	
	21	4.15	----	4.20	
	24	4.57	4.80	----	
	26	4.78	----	4.80	

Tabla VII: a) continuación

a Los datos de cada columna corresponden a un animal disntinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correla- ción (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
	Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	2.61	11	0.97	0.138
Sorbato 0.76%	B	1.70	14	0.96	0.206
Sorbato 3.0%	C	1.84	9	0.91	0.204
Sorbato 4.0%	D	1.63	7	0.95	0.128

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$

0.76% - 3.0% Sorbato: $F_{exp.} = 5.36$ $F_{teórico} = 3.52$ $v_1 = 2$ $v_2 = 19$ Nivel = 0.05

Tabla VII: b) pH de la carne = 5.90

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a		
Control	0	3.90 ^b	3.72 ^b	
	3	3.67	3.55	
	5	3.80	3.51	
	7	4.15	4.05	
	10	4.95	----	
	12	-----	5.14	
	14	5.35	-----	
	18	4.95	5.39	
	21	5.40	5.42	
Sorbato 0.76%	0	4.10 ^b	3.72 ^b	3.96 ^b
	3	3.75	3.52	3.60
	5	3.93	3.80	3.75
	7	4.20	3.80	3.97
	12	4.39	4.30	3.85
	18	5.65	5.25	5.40
	21	5.41	5.20	5.24
Sorbato 3.0%	0	3.90 ^b	3.80 ^b	4.22 ^b
	5	3.25	3.37	3.85
	7	3.65	3.67	4.00
	10	3.80	3.90	4.00
	14	4.05	4.13	4.40
	18	4.95	4.76	5.05
	21	5.22	5.30	5.43
	26	5.15	5.25	5.40
Sorbato 4.0%	0	3.90 ^b	3.80 ^b	4.22 ^b
	5	3.30	3.26	3.70
	7	3.44	3.35	3.80
	10	3.61	3.54	4.00
	14	3.79	3.82	4.16
	18	4.35	4.90	4.75
	21	5.10	5.04	5.15

Tabla VII: b) continuación

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

Tratamiento		Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
		Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	2.54	0.225	6	0.98	0.144
Sorbato 0.76%	B	1.67	0.209	6	0.95	0.249
Sorbato 3.0%	C	1.73	0.176	6	0.92	0.179
Sorbato 4.0%	D	1.58	0.168	9	0.94	0.194

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$
(Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

0.76% - 3.0% Sorbato: $F_{exp.} = 6.74$ $F_{teórico} = 4.46$ $v_1 = 2$ $v_2 = 8$ nivel = 0.05

Tabla VII: c) pH de al carne = 6.00

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	3.67 ^b	3.80 ^b	4.13 ^b	
	3	3.30	----	3.90	
	5	3.62	3.80	----	
	7	4.45	4.34	4.05	
	10	----	5.15	4.95	
	12	5.20	5.48	----	
	14	5.51	5.58	5.10	
	18	5.75	----	5.80	
	21	----	5.60	5.70	
Sorbato 3.0%	0	3.67 ^b	3.80 ^b	3.94 ^c	4.13 ^b
	3	3.25	----	3.50	3.65
	5	3.20	4.10	----	3.70
	7	3.69	4.30	4.00	----
	10	----	4.25	4.45	4.32
	12	4.47	4.82	----	4.75
	14	5.38	5.15	5.00	5.30
	18	5.00	----	5.20	5.85
	21	----	5.18	----	5.60
Sorbato 4.0%	0	3.67 ^b	3.80 ^b	3.94 ^c	4.13 ^b
	3	----	----	3.25	3.40
	5	3.38	3.40	----	3.51
	7	3.75	3.45	3.84	----
	10	----	4.12	4.15	4.37
	12	4.56	4.76	----	4.78
	14	4.80	5.08	5.12	4.91
	18	5.03	----	5.00	5.30
	21	----	5.10	5.20	5.15
	24	5.10	5.07	----	----

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto.

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento		Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos	Coefficiente de correlación	Desvío Standard de la regresión
		Ordenada al origen	Pendiente	(n)	(r)	(Sr)
Control	A	2.60	0.236	9	0.97	0.171
Sorbato 3.0%	B	2.12	0.219	10	0.93	0.155
Sorbato 4.0%	B	2.34	0.189	10	0.94	0.132

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$ (Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

3.0% - 4.0% Sorbato: $F_{exp.} = 2.45$ $F_{teórico} = 3.63$ $v_1 = 2$ $v_2 = 16$ nivel = 0.05

Tabla VIII : Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de Enterobacteriaceae durante el almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C.

a) pH de la carne = 5.70

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	3.00 ^b	2.90 ^b		
	3	2.98	2.70		
	5	3.58	----		
	7	----	4.25		
	10	4.75	4.70		
	12	5.18	----		
	14	----	5.50		
	18	5.35	----		
	21	5.40	5.30		
	24	----	5.20		
	40	----	5.50		
Sorbato 3.0%	0	2.90 ^b	2.90 ^b	2.70 ^c	3.00 ^c
	3	----	2.45	2.50	2.70
	5	2.50	----	2.75	----
	7	2.75	3.20	----	2.95
	10	----	3.30	3.00	----
	12	3.50	----	----	3.80
	14	4.20	4.00	4.05	4.44
	18	4.15	4.30	----	4.30
	21	4.15	----	4.35	4.20
	24	----	4.60	----	----
Sorbato 4.0%	33	3.83	----	----	----
	40	----	4.00	----	----
	0	3.00 ^c	2.90 ^b	2.70 ^c	
	3	----	----	2.25	
	5	2.50	2.30	2.30	
	7	----	2.80	----	
	10	3.25	3.00	3.15	
	12	3.70	----	3.50	
	14	----	4.00	3.60	
	18	4.20	4.20	4.17	
	21	4.20	----	4.25	
	24	----	4.30	----	

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tabla VIII: a) continuación

Tratamiento		Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
		Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	2.18	0.258	7	0.98	0.179
Sorbato 3.0%	B	1.63	0.176	11	0.92	0.235
Sorbato 4.0%	B	1.46	0.171	7	0.88	0.177

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$
(Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

3.0% - 4.0% Sorbato: $F_{exp.} = 2.40$ $F_{teórico} = 3.74$ $v_1 = 2$ $v_2 = 14$ nivel = 0.05

Tabla VIII: b) pH de la carne = 6.00

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	2.90 ^b	2.77 ^b	3.10 ^b	
	3	3.20	----	3.49	
	5	3.43	3.70	----	
	7	3.60	4.08	4.30	
	10	----	5.30	5.00	
	12	5.55	5.85	----	
	14	5.72	5.90	6.00	
	18	5.97	----	6.20	
	21	----	5.80	6.16	
Sorbato 3.0%	0	2.90 ^b	2.77 ^b	2.80 ^c	3.10 ^b
	3	2.80	----	2.70	3.00
	5	3.05	2.90	----	----
	7	3.45	3.50	3.82	3.79
	10	----	4.10	3.97	4.18
	12	4.20	4.44	----	4.60
	14	5.06	5.28	5.00	4.75
	18	5.00	----	5.55	4.80
	21	----	5.49	----	5.00
Sorbato 4.0%	0	2.90 ^b	2.77 ^b	2.80 ^c	3.10 ^b
	3	----	----	2.70	2.76
	5	2.90	2.80	----	----
	7	3.25	3.50	3.31	3.45
	10	----	3.90	3.78	4.05
	12	4.24	4.18	----	4.45
	14	4.60	5.03	4.70	5.10
	18	5.02	----	4.90	5.36
	21	----	5.00	----	5.25
	24	5.16	4.90	4.86	----

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto.

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos	Coefficiente de correlación	Desvío Standard de la regresión	
	Ordenada al origen	Pendiente	(n)	(r)	(Sr)	
Control	A	2.28	0.276	11	0.96	0.289
Sorbato 3.0%	B	2.00	0.214	16	0.97	0.177
Sorbato 4.0%	C	1.83	0.213	16	0.98	0.161

3.0% - 4.0% Sorbato: F exp. = 7.59 F teórico = 3.34 $v_1 = 2$ $v_2 = 28$ nivel = 0.05

Tabla IX : Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de levaduras durante el almacenamiento en EVA-SARAN-EVA a 4°C.

a) pH de la carne = 5.70

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	2.74 ^b	3.22 ^b	3.00 ^b	3.38 ^b
	3	2.67	3.07	----	3.15
	5	3.60	----	3.50	3.65
	7	----	3.60	4.01	3.70
	10	3.98	4.14	4.10	4.07
	12	4.40	----	----	4.35
	14	----	5.08	4.80	4.65
	18	4.80	----	4.80	4.65
	21	4.78	5.05	4.95	4.70
	24	----	----	----	----
	26	5.00	----	----	----
	33	4.90	----	----	----
Sorbato 0.76%	0	3.00 ^b	3.38 ^b	3.26 ^c	
	3	----	2.66	----	
	5	3.00	2.66	2.80	
	7	3.00	2.71	3.15	
	10	3.25	3.40	3.40	
	12	----	3.61	3.80	
	14	4.00	3.94	4.30	
	18	----	4.10	4.50	
	21	4.45	----	----	
Sorbato 3.0%	0	2.74 ^b	3.22 ^b	2.70 ^c	3.10 ^c
	3	----	2.60	2.30	2.90
	5	2.70	----	2.60	----
	7	2.95	2.90	----	2.80
	10	----	2.96	3.00	----
	12	3.50	----	----	3.30
	14	3.70	3.80	3.40	3.60
	18	4.25	4.00	----	3.90
	21	4.50	4.28	3.90	3.93
	24	----	4.45	----	----
	26	4.30	----	4.15	----
Sorbato 4.0%	0	3.10 ^c	3.22 ^b	2.70 ^c	
	3	----	----	2.30	
	5	2.60	3.27	2.55	
	7	----	2.82	----	
	10	3.10	3.00	2.85	
	12	3.07	----	2.80	
	14	----	3.20	3.28	
	18	3.76	3.38	3.50	
	21	4.25	----	4.00	
	24	4.15	4.25	----	

Tabla IX: a) continuación

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
	Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	2.64	18	0.96	0.189
Sorbato 0.76%	B	2.07	13	0.94	0.196
Sorbato 3.0%	C	1.81	11	0.93	0.154
Sorbato 4.0%	D	1.47	9	0.94	0.175

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$
(Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

0.76% - 3.0% Sorbato: $F_{exp.} = 9.58$ $F_{teórico} = 3.49$ $v_1 = 2$ $v_2 = 20$ nivel = 0.05

Tabla X : Influencia de la concentración de sorbato de potasio en el desarrollo de los microorganismos totales durante el almacenamiento en EVA-SARAN -EVA a 0°C.

pH de la carne = 5.90

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/cm ² a			
Control	0	4.35 ^b	4.30 ^b	4.40 ^b	4.45 ^c
	7	4.20	----	4.10	4.30
	12	----	4.25	----	4.45
	14	4.40	4.50	4.20	4.60
	24	----	5.55	5.65	5.75
	32	6.10	----	6.20	5.95
	38	6.97	7.10	----	7.00
	48	----	7.65	7.35	----
	62	7.31	----	7.60	----
	76	----	----	7.33	7.40
	110	7.22	----	----	7.50
Sorbato 3.0%	0	4.35 ^b	4.30 ^b	4.40 ^b	4.45 ^c
	7	4.15	4.04	4.20	----
	14	4.38	4.20	4.32	4.40
	25	4.76	4.60	5.00	4.90
	41	5.40	5.75	5.60	----
	48	----	5.80	6.00	6.10
	62	6.40	----	6.70	----
	72	7.15	----	----	6.90
	80	7.00	7.15	----	----
	110	7.00	6.90	7.17	----
Sorbato 4.0%	0	4.35 ^b	4.30 ^b	4.40 ^b	
	7	4.20	4.00	4.10	
	14	4.18	4.42	4.10	
	25	4.58	4.34	4.70	
	41	5.40	5.15	5.60	
	48	5.51	5.30	5.69	
	62	6.20	6.00	6.30	
	72	6.92	6.70	6.88	
	76	7.05	6.75	6.60	
	80	6.80	6.90	6.50	
	110	6.90	6.70	6.44	

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto.

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

c Resultados correspondientes al promedio de tres muestras

Tabla X: continuación

Tratamiento		Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
		Ordenada al origen	Pendiente			
Control Sorbato 3.0%	A	3.07	0.101	15	0.98	0.185
Sorbato 3.0%	B	3.65	0.047	14	0.98	0.155
Sorbato 4.0%	C	3.41	0.045	18	0.98	0.190

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$
(Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

3.0% - 4.0% Sorbato: $F_{exp.} = 12.19$ $F_{teórico} = 3.34$ $v_1 = 2$ $v_2 = 28$ nivel = 0.05

Tabla XI: Efecto de la concentración de sorbato de potasio agregada al medio de cultivo y pH del mismo sobre el crecimiento de los microorganismos totales.

a) pH del medio de cultivo = 5.60

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/ml a		
Control	0	3.10 ^b	3.18 ^b	3.21 ^b
	3	2.85	3.00	----
	5	2.98	3.00	3.20
	7	3.23	3.45	3.60
	10	4.08	4.55	4.32
	14	5.15	5.50	5.28
Sorbato 0.025%	0	3.10 ^b	3.07 ^b	3.27 ^b
	3	2.71	2.80	----
	5	2.90	2.78	3.00
	7	3.00	3.53	3.10
	10	3.67	4.15	3.85
	14	4.25	4.60	5.32
Sorbato 0.05%	0	3.10 ^b	3.03 ^b	3.15 ^b
	3	2.60	2.40	----
	5	2.60	2.45	2.66
	7	2.96	2.81	3.15
	10	3.50	3.67	3.80
	14	4.55	4.70	4.30
Sorbato 0.10%	0	2.70 ^b	2.90 ^b	3.00 ^b
	3	2.48	2.60	----
	5	2.55	2.60	2.67
	7	2.70	2.84	3.00
	10	3.05	3.32	3.50
	14	3.90	4.13	4.06
Sorbato 0.20%	0	2.73 ^b	2.90 ^b	
	3	2.15	----	
	5	2.05	2.20	
	7	2.40	2.68	
	10	2.90	3.20	
	14	3.35	3.71	
	18	3.80	4.18	

a Los datos de cada columna corresponden a un animal distinto

b Resultados correspondientes al promedio de dos muestras

Tabla XI: a) continuación

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
	Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	1.58	9	0.98	0.191
Sorbato 0.025%	B	1.54	12	0.96	0.312
Sorbato 0.05%	B	1.50	8	0.95	0.266
Sorbato 0.10%	C	1.41	9	0.98	0.151
Sorbato 0.20%	D	1.88	6	0.91	0.213

Tratamientos con distinta letra mayúscula son significativamente diferentes $P < 0.05$
(Método de Neter y Wasserman (1974), Apéndice 3 b)

0.025% - 0.05% Sorbato: $F_{exp.} = 2.28$ $F_{teórico} = 3.63$ $v_1 = 2$ $v_2 = 16$ nivel = 0.05

Tabla.XI b): pH del medio de cultivo = 5.90

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/ml			a
Control	0	3.15 ^b	3.20 ^b	3.20 ^b	
	3	2.90	2.95	----	
	5	2.72	2.98	3.05	
	7	3.68	3.33	3.53	
	10	4.60	4.00	4.23	
	14	----	5.55	5.25	
Sorbato 0.025%	0	3.20 ^b	3.07 ^b	3.16 ^b	
	3	2.95	2.80	----	
	5	2.46	2.90	3.00	
	7	3.30	3.05	3.66	
	10	4.20	4.07	4.33	
	14	5.25	5.00	5.13	
Sorbato 0.05%	0	3.00 ^b	2.95 ^b	3.30 ^b	
	3	----	2.38	----	
	5	2.50	2.38	2.75	
	7	3.05	2.96	3.03	
	10	3.63	4.05	4.20	
	14	4.80	4.40	4.53	
Sorbato 0.10%	0	2.90 ^b	2.95 ^b	3.16 ^b	
	3	2.60	2.35	----	
	5	2.60	2.85	2.73	
	7	2.75	2.98	3.21	
	10	3.60	3.18	3.50	
	14	4.30	4.25	4.49	
Sorbato 0.20%	0	2.60 ^b	3.00 ^b		
	3	2.10	----		
	5	2.12	2.35		
	7	2.65	2.90		
	10	3.15	3.50		
	14	4.06	4.20		
Sorbato 0.30%	0	2.40 ^b	3.06 ^b		
	3	2.20	----		
	5	2.20	2.53		
	7	2.25	2.67		
	10	3.20	3.04		
	14	3.80	3.58		
Sorbato 0.30%	0	4.00	4.29		
	3				
	5				
	7				
	10				
	14				

Tabla XI: b) continuación

Tratamiento		Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correla- ción (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
		Ordenada al origen	Pendiente			
Control	A	1.61	0.269	8	0.97	0.211
Sorbato						
0.025%	A	1.59	0.254	9	0.97	0.197
Sorbato						
0.05%-	B	1.58	0.220	9	0.95	0.219
Sorbato						
0.10%	C	1.48	0.204	12	0.98	0.183
Sorbato						
0.20%	D	1.63	0.173	6	0.96	0.210
Sorbato						
0.30%	E	1.86	0.128	6	0.96	0.144

Control 0.025% Sorbato: F exp. = 0.95 F teórico = 3.80 $v_1 = 2$ $v_2 = 13$ nivel = 0.05
 0.025% - 0.05% " " = 6.75 " = 3.74 $v_1 = 2$ $v_2 = 14$ " "

Tabla XI : c) pH del medio de cultivo = 6.10

Tratamiento	Días de almacenamiento	Recuentos expresados en log UFC/ml a		
Control	0	3.30 ^b	3.18 ^b	3.20 ^b
	3	3.00	2.90	----
	5	3.43	3.07	3.15
	7	3.23	3.18	3.74
	10	4.33	4.43	4.47
	14	5.50	5.26	5.15
Sorbato 0.05%	0	3.20 ^b	2.97 ^b	3.20 ^b
	3	----	2.53	----
	5	3.40	2.85	2.90
	7	3.75	3.17	3.22
	10	4.00	3.60	4.20
	14	5.28	5.06	4.73
Sorbato 0.10%	0	3.15 ^b	3.10 ^b	3.00 ^b
	3	2.70	2.48	----
	5	----	2.48	2.83
	7	3.16	3.04	2.94
	10	3.59	3.92	4.00
	14	4.49	4.40	5.00
Sorbato 0.20%	0	3.00 ^b	2.95 ^b	3.30 ^b
	3	----	2.30	----
	5	2.60	2.32	2.48
	7	3.00	2.91	2.58
	10	3.70	3.45	3.30
	14	4.25	4.40	4.39
Sorbato 0.30%	0	2.60 ^b	3.10 ^b	
	3	2.16	----	
	5	2.55	2.20	
	7	2.31	2.63	
	10	3.27	3.40	
	14	3.90	4.32	
Sorbato 0.40%	0	2.57 ^b	2.96 ^b	
	3	2.00	----	
	5	2.03	2.25	
	7	2.50	2.88	
	10	3.00	3.10	
	14	3.60	3.85	
	18	3.75	4.30	

Tabla XI: c) continuación

Tratamiento	Parámetros correspondientes a la regresión lineal		Nº de datos (n)	Coeficiente de correlación (r)	Desvío Standard de la regresión (Sr)
	Ordenada al origen	Pendiente			
Control Sorbato	A	1.56	9	0.97	0.113
0.05% Sorbato	B	1.67	9	0.94	0.291
0.10% Sorbato	C	1.52	9	0.96	0.224
0.20% Sorbato	D	1.64	9	0.98	0.138
0.30% Sorbato	E	1.87	6	0.94	0.212
0.40% Sorbato	F	1.89	6	0.90	0.242

Control 0.05% Sorbato: $F_{exp.} = 5.78$ $F_{teórico} = 3.74$ $v_1 = 2$ $v_2 = 14$ nivel = 0.05
 0.05% - 0.10% " " = 15.65 " = 3.74 $v_1 = 2$ $v_2 = 14$ " "

NOMENCLATURA

- A : área de tejido expuesta (cm^2)
- A' : área de permeación de los gases a través de la película de envase (cm^2)
- a, b: parámetros de cromaticidad de la escala Hunter Lab.
- \bar{C} : concentración de gas disuelta en el tejido ($\mu\text{l/g}$).
- C_s : concentración de gas disuelta en la interfase músculo-gas ($\mu\text{l/g}$).
- D : coeficiente de difusión de oxígeno en el tejido (cm^2/seg).
- E : energía de activación (Kcal/mol).
- f : relación entre la concentración de ácido sórbico no disociado y la concentración total de ácido sórbico. (Ec.(23)).
- G : producción de CO_2 ($\mu\text{l/h/g}$).
- H : constante de Henry(atm).
- I : índice de inhibición definido en la Ec. (25).
- K : constante de disociación del ácido sórbico (Ec. (19)).
- k_{dis} : constante definida en la Ec. (37).
- $k_{\text{n.dis}}$: constante definida en la Ec. (36).
- k_θ : parámetro de la Ec. (42).
- k_μ : parámetro de la Ec. (43).
- L : parámetro de luminosidad de la escala Hunter Lab.
- m.c.i.: mínima concentración inhibitoria.
- N : número de microorganismos (UFC/ cm^2).
- P : presión total (atm).
- \mathcal{P} : permeabilidad gaseosa de la película de envase ($\text{cm}^3/\text{h}/\text{cm}^2/\text{atm}$).
- p : presión parcial del soluto en fase gaseosa (atm).
- Q_{10} : coeficiente de incremento de velocidad de reacción por cada 10°C de elevación de la temperatura.

R : consumo de oxígeno por el tejido ($\mu\text{l/h/g}$).

R_b : consumo de oxígeno por las bacterias ($\mu\text{l/h/cm}^2$).

T : temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

t : tiempo

"t": parámetro de Student

t_{10^7} : tiempo necesario para alcanzar una densidad celular de 10^7 UFC/ cm^2 (días).

$t_{0.5}$: tiempo correspondiente a la mitad del período de almacenamiento (días).

V_c : volumen de carne (cm^3).

V_g : volumen gaseoso en el interior del envase (cm^3).

X : fracción molar del soluto en fase líquida (moles soluto/mol solución).

x_i : fracción de un determinado género microbiano con respecto a la flora total ($x_i = N_i/N$).

LETRAS GRIEGAS

α : $(\log e)^2 = (0.4343)^2$

γ : constante de la Ec. (5) ($\gamma = 3.47 \times 10^{-3}/\text{h}$)

δ : penetración de oxígeno en el tejido (cm)

θ : fase de latencia de los microorganismos (días).

θ' : fase de latencia de los microorganismos en el caso de utilizar soluciones preservadoras de sorbato de potasio (días).

μ : velocidad de crecimiento de los microorganismos, durante la fase exponencial (1/día).

μ' : velocidad de crecimiento de los microorganismos, durante la fase exponencial, en el caso de utilizar soluciones preservadoras de sorbato de potasio (1/día).

μ_w : viscosidad del agua (cp)

ν : grados de libertad

ρ : densidad de la carne = 1.06 g/cm^3

ϕ_{dis} : parámetro definido en la Ec. (30).

$\phi_{n,dis}$: parámetro definido en la Ec. (29).

ω : fracción volumétrica de gases

Subíndices

e : externo

i : componentes de la población microbiana

o : inicial

Supraíndices

* : estado de referencia correspondiente a la mitad del período de almacenamiento.

— : valor promedio.